



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología

**Validación del método analítico microbiológico:
valoración de bacitracina 50 000ui/100g en un
producto terminado**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Yeivi Susan GALINDO REYES

ASESOR

Jorge LEÓN QUISPE

Mayela Yajaida CÉSPEDES JARA

Lima, Perú

2012

Referencia bibliográfica

Galindo, Y. (2012). *Validación del método analítico microbiológico: valoración de bacitracina 50 000ui/100g en un producto terminado*. Tesis para optar el título de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

A mis PADRES,
por su apoyo, dedicación
e incondicional amor.

“Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.
Descansar, es empezar a morir.”

Gregorio Marañón

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la vida y por las oportunidades que ha puesto en mi camino.

A mi familia, por su amor incondicional, preocupación constante y por el apoyo que siempre me han brindado.

Al Mag. Jorge León, mi asesor, por la confianza depositada y por contribuir a mi formación profesional.

A mi co-asesora, la Q.F. Mayela Céspedes, por hacer posible la realización de esta tesis, por su guía y apoyo desinteresado.

Al laboratorio farmacéutico San Joaquín Roxfarma, por la oportunidad de realizar mis prácticas profesionales en el ámbito de la farmacéutica y permitirme realizar esta tesis.

A mis revisores de Tesis, por su tiempo, dedicación y colaboración.

Finalmente a mis amistades, por su compañía, ayuda y cariño brindado.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. ANTIBIÓTICOS	4
2.1.1. Definición	4
2.1.2. Estado actual	4
2.1.3. Antibióticos tópicos	5
A. Ventajas	7
2.1.4. Clasificación de los antibióticos	8
A. Por su estructura química	8
B. Por su origen	8
C. Por su espectro de acción	12
D. Por su efecto antimicrobiano	12
E. Por su mecanismo de acción	13
2.1.5. Antibióticos que actúan sobre la pared celular	14
2.1.6. Antibióticos polipéptidos	15
2.2. BACITRACINA	17
2.2.1. Descripción	18
2.2.2. Solubilidad	18
2.2.3. Mecanismo de acción	18
2.2.4. Farmacocinética	19
2.2.5. Farmacodinamia	19
2.2.6. Espectro de acción y resistencia	19

2.2.7.	Efectos adversos	20
2.2.8.	Usos	21
2.3.	<i>Micrococcus luteus</i>	22
2.3.1.	Clasificación científica	22
2.3.2.	Características	22
2.3.3.	Bioquímica	23
2.3.4.	Patogénesis	23
2.3.5.	Usos industriales	23
2.4.	VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS ANTIBIÓTICOS	24
2.4.1.	Introducción	24
2.4.2.	Métodos	24
	A. Método de cilindro placa	24
	B. Método turbidimétrico	25
2.4.3.	Definiciones	25
2.4.4.	Factores determinantes	26
2.5.	VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA BACITRACINA	26
2.5.1.	Aparato	26
2.5.2.	Control de temperatura	27
2.5.3.	Espectrofotometría	27
2.5.4.	Receptáculos de valoración en cilindro – placa	27
2.5.5.	Medio y diluyente	28
	A. Medio	28
	B. Solución amortiguadora de fosfato	29
2.5.6.	Unidades y estándares de referencia	29
2.5.7.	Preparación del estándar	30
2.5.8.	Preparación de la muestra	31

2.5.9. Organismo e inóculo	31
A. Organismo de prueba	31
B. Preparación del inóculo	31
2.5.10. Procedimiento	33
A. Diseños de valoración	33
B. Método de cilindro – placa	36
2.5.11. Cálculo	37
2.6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	37
2.6.1. Generalidades	37
2.6.2. Definición	38
A. Definición general	38
B. Definición analítica	39
2.6.3. Razones que justifican la validación de métodos analíticos	39
2.6.4. Métodos susceptibles de ser validados	40
2.6.5. Entorno legal	40
A. Normatividad internacional	40
B. Normatividad nacional	41
2.6.6. Fases en el desarrollo de un método analítico y criterios de validación	42
2.6.7. Datos requeridos para la validación	45
2.7. VALIDACIÓN: VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS	47
2.7.1. Linealidad	47
A. Definición	47
B. Determinación de linealidad	48
2.7.2. Exactitud	49
A. Definición	49

B. Determinación de exactitud	49
2.7.3. Precisión	51
A. Definición	51
B. Determinación de precisión	51
2.7.4. Especificidad	52
A. Definición	52
B. Determinación de especificidad	53
2.7.5. Intervalo	53
A. Definición	53
B. Determinación de intervalo	53
3. OBJETIVOS	55
3.1. Objetivo general	55
3.2. Objetivos específicos	55
4. MATERIAL Y MÉTODOS	66
4.1. Material biológico	56
4.2. Muestra y antibióticos	56
4.3. Métodos	57
4.3.1. Preparación de la cepa	57
4.3.2. Preparación del inóculo	57
4.3.3. Preparación de placas de Petri de valoración	58
4.3.4. Preparación del estándar (St) y de la muestra (M)	59
A. Estándar	59
B. Muestra	60
4.3.5. Proceso de validación: parámetros a evaluar	60
A. Linealidad	60
B. Exactitud	62

C. Precisión	63
D. Especificidad	64
E. Intervalo	64
4.3.6. Análisis de datos: criterios de aceptación	65
A. Linealidad	65
B. Exactitud	65
C. Precisión	66
D. Especificidad	66
E. Intervalo	66
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
5.1. Linealidad	78
5.2. Exactitud	79
5.3. Precisión	86
5.3.1. Repetibilidad	86
5.3.2. Precisión intermedia	93
5.4. Especificidad	100
5.5. Intervalo	101
5.6. Ventajas respecto al método normalizado	101
6. CONCLUSIONES	103
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
8. ANEXOS	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos por su estructura química.	9
Tabla 2. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.	14
Tabla 3. Composición del medio 1.	28
Tabla 4. Organismo de prueba para la valoración del antibiótico bacitracina.	32
Tabla 5. Preparación de la solución madre y dilución de prueba del estándar de referencia de bacitracina.	35
Tabla 6. Preparación del inóculo.	35
Tabla 7. Datos requeridos para la validación.	46
Tabla 8. Tamaño de los halos de los cinco niveles de concentraciones	67
Tabla 9. Datos obtenidos del análisis de regresión de la recta estándar y de la recta muestra.	71
Tabla 10. Datos obtenidos del análisis de regresión de la varianza de la recta estándar.	74
Tabla 11. Datos obtenidos del análisis de regresión de la varianza de la recta muestra.	74
Tabla 12. Datos obtenidos del análisis de regresión conjunta de dos rectas de regresión.	78
Tabla 13. Tamaño de los halos del estándar.	80
Tabla 14. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras.	81
Tabla 15. Datos obtenidos en la evaluación del parámetro exactitud en el proceso de validación de bacitracina.	86
Tabla 16. Tamaño de los halos del estándar.	87
Tabla 17. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras.	88
Tabla 18. Análisis estadístico: test de normalidad (Kolmogorov).	92

Tabla 19. Datos obtenidos en la evaluación del parámetro precisión (repetibilidad) en el proceso de validación de bacitracina.	93
Tabla 20. Tamaño de los halos del estándar.	94
Tabla 21. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras.	95
Tabla 22. Análisis estadístico: test de normalidad (Kolmogorov).	99
Tabla 23. Datos obtenidos en la evaluación del parámetro precisión (precisión intermedia) en el proceso de validación de bacitracina.	99
Tabla 24. Datos obtenidos en la evaluación del parámetro especificidad en el proceso de validación de bacitracina.	100
Tabla 25. Datos obtenidos en la evaluación del parámetro intervalo en el proceso de validación de bacitracina.	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la bacitracina.	17
Figura 2. Modo de distribución del estándar y de la muestra en una placa de Petri.	59
Figura 3. Gráfica de línea ajustada de la recta estándar.	72
Figura 4. Gráfica de línea ajustada de la recta muestra.	72
Figura 5. Gráfica de probabilidad normal de la recta estándar.	75
Figura 6. Gráfica de probabilidad normal de la recta muestra.	75
Figura 7. Gráfica de residuales de la recta estándar.	76
Figura 8. Gráfica de residuales de la recta muestra.	77
Figura 9. Gráfica de dispersión de la recta estándar y de la recta muestra.	79

RESUMEN

La valoración microbiológica de los antibióticos es un parámetro fundamental para asegurar un alto nivel de efectividad y eficiencia en los productos farmacéuticos.

En el presente trabajo se desarrolla y valida un método analítico microbiológico para la valoración del antibiótico bacitracina 50 000 UI/100g en productos farmacéuticos de uso tópico.

El procedimiento incluye el uso del medio N°11 (pH 6,5) como agar base, a *Micrococcus luteus* ATCC 10240 como microorganismo testigo y al método de difusión en agar como el diseño de valoración elegido.

En el presente trabajo se describe el proceso de validación del método analítico microbiológico para la valoración del antibiótico bacitracina 50 000 UI/100g en productos terminados, incluyendo los requisitos exigidos en la determinación de los parámetros analíticos de linealidad, exactitud y precisión expresadas en sus dos formas: repetibilidad y precisión intermedia así como, especificidad e intervalo.

Los resultados y análisis estadísticos permitieron demostrar que el método analítico propuesto para la valoración del antibiótico bacitracina es lineal ($r^2 = 0,968$ linealidad del estándar y $r^2 = 0,962$ linealidad de la muestra), exacto (sesgo $< 3\%$ y $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$), preciso (CV $< 5\%$, tolerancia $< 30\%$) y específico (placebo y blanco sin formación de halos) para el respectivo intervalo especificado.

Se establece que las características de desempeño analítico cumplen con los requisitos para la aplicación analítica propuesta siendo un método efectivo, reproducible y confiable para ser utilizado en la comprobación de las especificaciones de calidad.

Palabras claves: bacitracina, método analítico, difusión en agar, *Micrococcus luteus*, validación.

ABSTRACT

The microbiological assay of antibiotics is a critical parameter to ensure a high level of effectiveness and efficiency in pharmaceutical products.

This study develops and validates a microbiological analytical method for assessing the antibiotic bacitracin 50 000 UI/100g in topical pharmaceuticals.

The method includes using the medium N° 11 (pH 6,5) as agar base, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 as microorganism control and agar diffusion method as titration design chosen.

This research described the validation process of the microbiological analytical method for the assessment of antibiotic bacitracin 50 000 UI/100g into finished products, including the analytical parameters requirements as linearity, accuracy and precision expressed in two ways: repeatability and intermediate precision as well as specificity and range.

The results and statistical analysis enabled the demonstration that the analytical method proposed for the evaluation of the antibiotic bacitracin is linear ($r^2 = 0,968$ linearity of the standard and $r^2 = 0,962$ linearity of the sample), accurate (slant $< 3\%$ and $y_{t_{exp}} < t_{tab}$), precise (CV $< 5\%$, tolerance $< 30\%$) and specific (placebo and blank without forming halos) for the respective interval.

In conclusion the analytical performance characteristics meet the requirements for analytical application proposal being an effective, reproducible and reliable method to be used in checking the quality specifications.

Keywords: bacitracin, analytical method, agar diffusion, *Micrococcus luteus*, validation.

1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos adquieren día a día, gran difusión y extensa aplicación terapéutica-preventiva y profiláctica para combatir numerosas infecciones; sin embargo, su empleo se ha generalizado tanto que se hace obligatorio su control sistemático, tanto por los laboratorios industriales farmacéuticos que los fabrican y elaboran, cuanto por los organismos estatales que los autorizan y fiscalizan (Pérez, 1963).

La industria farmacéutica peruana se ha visto, a través del tiempo, obligada al empleo de técnicas generales y convencionales, en la fabricación e industrialización de los antibióticos. Procesos que se inician, con la fermentación o síntesis del producto y su purificación, así como el control permanente del grado de pureza, inocuidad y eficacia de los mismos, sobre todo el establecimiento de la actividad o potencia del producto obtenido (Pérez, 1963).

La valoración microbiológica de antibióticos, conceptualizada como el contenido de principio activo o fármaco presente en un producto farmacéutico o en una unidad de dosificación, es un parámetro fundamental para garantizar el cumplimiento de ciertas especificaciones que aseguran un alto nivel de efectividad y eficiencia en los productos farmacéuticos (Leyva *et al.*, 2001) y permite bajo las condiciones adecuadas demostrar la actividad de los antibióticos, por medio de su efecto inhibitor sobre los microorganismos (AEFI, 2001) .

Bacitracina es un antibiótico polipeptídico muy empleado para el tratamiento tópico de infecciones de piel, conjuntivas, sinusitis, faringitis, traqueobronquitis, infecciones mandibulares, oculares, entre otros (Gennaro, 2003). El método normalizado internacionalmente para la valoración microbiológica de este antibiótico, en la farmacopea vigente, especifica el uso del método por difusión en gel de agar, presenta a *Micrococcus luteus* ATCC 10240 como el microorganismo testigo y al medio N° 1 como el agar base

para su valoración (USP 34, 2011). Sin embargo, en los ensayos en laboratorio no siempre se obtiene crecimiento de dicha cepa en tal medio, a pesar de ser ensayos múltiples, por lo que se hace necesario, modificar el método normalizado, confirmando que el método es apto para el fin previsto.

Las normativas internacionales (informe 32 de la Organización Mundial de la Salud, 1992 y Normas Europeas de Correcta Fabricación de Medicamentos, 2001) y nacionales (Norma Técnica Peruana NTP-ISO/IEC 17025, 2006; Ley N° 26842 Ley General de Salud, 2009; Ley N° 29459 Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios, 2010; Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos, 1999; Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios, 2011; y las Disposiciones para el Control de la calidad y el suministro de información sobre medicamentos, 2001), contemplan la necesidad de validar los métodos analíticos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones en éstos, para que puedan efectuarse con eficacia y confiabilidad.

El método analítico a validar, se realiza por el método de difusión en gel de agar y utiliza al medio N° 11 como agar base para la valoración, debido a que mediante pruebas de laboratorio el microorganismo *Micrococcus luteus* ATCC 10240 crece satisfactoriamente en este medio. Este método genera un impacto económico mínimo (el medio N° 11 es uno de los medios más utilizados en los laboratorios farmacéuticos empleándose en la valoración de netilmicina, sisomicina, neomicina, paromomicina, eritromicina y gentamicina) (USP 34, 2011) y se ajusta a la realidad de la empresa (acceso a equipos e insumos), además de conllevar beneficios adicionales (obtención rápida de los resultados) justificando la inversión y el gasto adicional de la validación (Gutiérrez & Núñez, 2011).

El esquema de validación para la valoración microbiológica de antibióticos, por encontrarse dentro de la categoría I de las pruebas más habituales para las que se exigen datos de validación según la farmacopea vigente (USP 34, 2011), presenta las siguientes características de desempeño analítico: **linealidad** (capacidad del procedimiento analítico para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado), **exactitud** (proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero, esta característica deberá establecerse en todo su intervalo), **precisión** (grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea), **especificidad** (capacidad del método de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz) e **intervalo** (amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito, incluyendo estos niveles, en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito). Estas características se verifican solo mediante estudios de laboratorio y deben cumplir con los criterios de aceptación especificados en la farmacopea vigente (United States Pharmacopoeia - USP 34, 2011) y en el Manual de Validación de Métodos Analíticos de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI, 2001).

Esta tesis presenta un método analítico alternativo y su respectiva validación para la valoración microbiológica de bacitracina, para laboratorios farmacéuticos que presenten dificultades en la implementación de los métodos normalizados. Es un método económico, factible, fiable y reproducible que proporciona un alto grado de confianza en los resultados obtenidos al aplicarlo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTIBIÓTICOS

2.1.1. Definición

El término antibiótico se refiere a sustancias de origen natural, artificial o extraídas de otros microorganismos que son capaces de frenar y/o destruir bacterias, hongos y protozoos (De Carlos, 2005).

El término antibiótico fue acuñado por Waksman que lo definió como “toda sustancia química derivada o producida por microorganismos que tienen la capacidad, a bajas concentraciones, de inhibir el desarrollo o de destruir las bacterias u otros microorganismos” (De Ahumada, 2002).

2.1.2. Estado actual

En los últimos treinta años, se han desarrollado nuevas moléculas de antibióticos que, fundamentalmente, han mejorado el perfil farmacocinético y farmacodinámico respecto a los antibióticos clásicos (Farmaindustria, 2004).

La investigación actual centra sus esfuerzos en torno a la decodificación de los genomas de las células procariotas para obtener nuevos fármacos que actúen a este nivel. Con las nuevas técnicas de secuenciación genómica se han conseguido identificar diversos puntos diana del ADN bacteriano, donde estos nuevos fármacos pueden actuar. También se han establecido tratamientos combinados de dos o más antibióticos que aumentan la capacidad bactericida del tratamiento (Farmaindustria, 2004).

Los nuevos macrólidos han mostrado su mayor eficacia en el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual, sinusitis, neumonía, así como patologías causadas por protozoos, incluso ampliando sus posibles indicaciones a enfermedades como la toxoplasmosis, una infección frecuente y grave en los pacientes con SIDA que suelen presentar numerosas complicaciones. Las últimas cefalosporinas son de administración oral, efectivas para tratar la gonorrea, o infecciones urinarias (Farmaindustria, 2004). Las nuevas quinolonas permiten el tratamiento por vía oral de infecciones como la osteomielitis, infecciones urinarias, prostatitis o diarreas bacterianas (Gurguí, 2003).

Las oxazolidinonas son antibióticos de reciente descubrimiento e implantación en el entorno sanitario que tienen un mecanismo de acción diferente al de otros antibióticos; su uso está indicado para tratar infecciones nosocomiales, infecciones cutáneas o subcutáneas, infecciones respiratorias o para infecciones generalizadas provocadas por microorganismos multirresistentes (Colizza *et al.*, 2003).

El desarrollo de nuevos antibióticos más potentes, con menores resistencias y pautas de administración simplificadas permitirá optimizar los beneficios en la salud que se obtienen de estos tratamientos, e ir reduciendo los más de 11 millones de muertes que se producen todavía anualmente a causa de infecciones curables mediante antibióticos (Jurado *et al.*, 2002).

2.1.3. Antibióticos tópicos

En dermatología se hace un amplio uso de los antibióticos, como profilácticos y como curativos de diversos cuadros infecciosos, al igual que sucede en otras especialidades médicas. Cuando se aplican sobre la piel y las mucosas los antibióticos pueden, por una parte, seleccionar cepas resistentes y por otra, provocar problemas de

sensibilización. Para evitar esto, dentro de lo posible, en el uso tópico de estos fármacos se deben seguir dos normas esenciales:

- Dar preferencia a los antibióticos más antiguos, con el fin de guardar los nuevos, por lo general los más potentes, para el caso de aparición de resistencias.
- Evitar el uso tópico de antibióticos que también se utilicen por vía sistémica, ya que una alergia provocada por el uso tópico, prohíbe el uso por vía sistémica.

Entre los antibióticos que cumplen estas condiciones se encuentran:

- Bacitracina, gramicidina y tirotricina, antibióticos polipeptídicos que sólo son útiles en infecciones producidas por cocos y bacilos Gram positivos. No se utilizan por vía sistémica por su gran toxicidad.
- Polimixina B, antibiótico útil en infecciones cutáneo - mucosas producidas por patógenos Gram negativos y algunos Gram positivos. También es útil por vía oral para tratar infecciones del tubo digestivo.
- Neomicina y framisetina, antibióticos aminoglucosídicos que no se utilizan por vía sistémica por su gran toxicidad, pero que se utilizan con frecuencia en preparaciones de uso tópico, solos o acompañados de alguno de los anteriores; su espectro es más amplio que los anteriormente citados.

Existen preparados para uso tópico que contienen antibióticos que también se utilizan por vía sistémica, como es el caso de: tetraciclinas, cloranfenicol, entre otros. Deben utilizarse solo cuando la indicación sea precisa debido a que cuando se aplican sobre mucosas o cuando existe efracción de la piel se pueden absorber cantidades suficientes como para producir toxicidad sistémica (De Ahumada, 2002).

A. Ventajas

El uso de antibióticos tópicos en la práctica dermatológica conlleva a ciertas ventajas sobre el tratamiento sistémico:

- Libera altas concentraciones del antibiótico directamente en el área de infección.
- Mínima absorción sistémica evitando la toxicidad y mínimo riesgo de efectos adversos sistémicos.
- Disminuye la inducción de resistencia bacteriana.
- Alta versatilidad, pudiendo ser usado en la profilaxis y tratamiento de infecciones.

Además podemos precisar en añadidura a lo mencionado, ventajas adicionales que diferencian a los antibióticos tópicos de los antisépticos, características que hacen que los antibióticos tópicos sean parte del arsenal terapéutico del dermatólogo:

- Son excelentes para su uso en heridas abiertas.
- Conservan la humedad de las heridas.
- Minimizan la adherencia de los vendajes.
- Proporcionan una opción segura y efectiva en la curación de heridas.

En general, está demostrado que los agentes antimicrobianos tópicos usados apropiadamente en heridas, disminuyen el riesgo de infección y morbilidad, ya que las heridas infectadas curan más lentamente y pueden llevar a una infección sistémica (Sáenz y Saldaña, 2005).

2.1.4. Clasificación de los antibióticos

Los criterios de clasificación son diversos, lo que origina varias claves que han permitido agruparlos según la estructura química, el origen, el espectro de actividad, el efecto antimicrobiano y el mecanismo de acción.

A. Por su estructura química

Según Suárez *et al.* (2007) los antibióticos se agrupan en familias, con propiedades generales similares, como se indica en la Tabla 1.

B. Por su origen

Según Granados y Villaverde (2003) se clasifican en:

- Biológicos: producidos por microorganismos (penicilina).
- Sintéticos: producidos por síntesis química (sulfamidas, quimioterápicos).
- Semisintéticos: sobre una base orgánica se mejora sintéticamente.

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos por su estructura química.

Betalactámicos		Penicilinas naturales: penicilina V, penicilina benzatina, bencilpenicilina, penicilina procaína.
		Penicilinas resistentes a la penicilinas: oxacilina, cloxacilina.
	<i>Penicilinas</i>	Aminopenicilinas: Ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, asociaciones con inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico o sulbactam).
		Carboxipenicilinas y acilureidopenicilinas: carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, asociaciones con ácido clavulánico o tazobactam.
	<i>Monobáctamicos</i>	Aztreonam
	<i>Cefalosporinas</i>	Primera generación: cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefalexina, cefadrina, cefadroxilo.
		Segunda generación: cefaclor, cefprozilo, cefamandol, cefuroxima, cefanidica.
		Cefamicinas: cefaxitina, cefmetazol, cefminox.
		Tercera generación: cefpodoxima, cefixima, ceftibuteno, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima.
		Cuarta generación: ceftiproma, cefepima.
	<i>Carbapenems</i> ⁽¹⁾	Ertapenem, imipenem, meropenem.

Fuente: Suárez *et al.*, 2007

⁽¹⁾ Poole y Peterson, 2006

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos por su estructura química (cont).

Aminoglucósidos	Neomicina, estreptomina, gentamicina, tobramicina, netilmicina, amikacina, espectinomicina.	
Anfenicoles	Cloranfenicol, tianfenicol.	
Glucopéptidos	Teicoplanina, vancomicina.	
Lincosaminas	Clindamicina, lincomicina.	
Macrólidos	14 átomos	Claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina.
	15 átomos	Azitromicina.
	16 átomos	Diacetil-midecamicina, espiramicina, josamicina.
Ketólidos	Telitromicina.	
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	
Nitroimidazoles	Metronidazol, ornidazol, tinidazol.	
Polipéptidos	Bacitracina, colistina, polimixina B.	
Quinolonas	1ra generación	Ácido nalidíxico, ácido oxolínic, ácido pipemídico, cinoxacino, rosoxacino.
	2da generación	Norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino, enoxacino, trovafloxacino, garenoxacino.
	3ra generación	Esparfloxacino, tosufloxacino.
	4ta generación	Moxifloxacino, gatifloxacino, gemifloxacino, clinafloxacino, trovafloxacino, garenoxacino.

Fuente: Suárez *et al.*, 2007

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos por su estructura química (cont).

Rifamicinas	Rifabutina, rifampicina, rifamixina.	
Sulfonamidas	Uso sistémico	Sulfadiazina, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfisoxazol.
	Uso tópico	Sulfacetamida, sulfadiazina argéntica.
Tetraciclinas	Vida media corta	Tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina.
	Vida media larga	Doxiciclina, minociclina.
Streptograminas	Quinupristina, dalfopristina.	
Oxazolidinonas	Linezolid.	
Otros antibióticos	Fosfomicina, ácido fusídico, metenamina, mupirocina, trimetoprima.	
Tuberculostáticos	Isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomycin, pirazinamida.	

Fuente: Suárez *et al.*, 2007

C. Por su espectro de acción

El número de clases o especies bacterianas sobre las que puede actuar un antimicrobiano se conoce como espectro de actividad. Los antimicrobianos se dividen, en función del tipo de microorganismo sobre el que tienen actividad, en antibacterianos, antivíricos, antifúngicos y antiprotozoarios. Asimismo, su espectro puede ser amplio, intermedio o reducido (Velásquez, 2008).

- *De amplio espectro*, pueden actuar sobre bacterias, hongos o protozoos. Interfieren en el crecimiento de más de uno de ellos o de numerosas especies bacterianas. Comprenden las tetraciclinas, el cloranfenicol y algunos β -lactámicos (Velásquez, 2008). Incluso actuarían sobre algunas rickettsias y virus grandes (Torres, 2002).
- *De espectro menos amplio o intermedio*, actúan frente a un número más limitado de especies. Este grupo incluye la mayoría de los antimicrobianos, entre los que destacan los macrólidos y aminoglucósidos (Velásquez, 2008).
- *De espectro reducido*, sólo tienen un comportamiento eficaz frente a un número limitado de especies, como los glucopéptidos (Velásquez, 2008).

Esta clasificación tiende a sufrir modificaciones frecuentes debido a la aparición de resistencias. Además, las fronteras entre un espectro u otro son subjetivas (Torres, 2002).

D. Por su efecto antimicrobiano

Los antibióticos se dividen en bacteriostáticos y bactericidas.

- *Bacteriostáticos*. Bloquean el desarrollo y la multiplicación de las bacterias, pero no las lisan, por lo que, al retirar el antimicrobiano, su efecto es reversible. Este es el caso de las tetraciclinas, sulfamidas, trimetropima, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas.
- *Bactericidas*. Provocan la muerte bacteriana y, por consiguiente, el proceso es irreversible. Comprenden los siguientes: β -lactámicos, aminoglucósidos, fosfomicina, nitrofurantoínas, polipéptidos, quinolonas, rifampicina y vancomicina.

Algunos agentes antimicrobianos pueden ser bacteriostáticos o bactericidas según la existencia de algunos factores, como el tipo de patógeno, el crecimiento celular, la concentración del antibiótico, el tiempo de contacto o las características del medio (éste es el caso de las tetraciclinas) (Velásquez, 2008).

E. Por su mecanismo de acción

Se dividen en varios grupos según lo indicado en la Tabla 2. Los antibióticos con estructuras químicas muy diversas pueden tener el mismo mecanismo de acción (Velásquez, 2008).

Tabla 2. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.

Antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana

B-lactámicos, cicloserina, vancomicina, bacitracina y fosfomicina.

Antibióticos que actúan sobre la membrana bacteriana

Poliptéridicos, poliénicos y agentes antifúngicos como la nistatina y anfotericina B.

Antibióticos que actúan sobre la síntesis de proteínas

Cloranfenicol, macrólidos, tetraciclinas y aminoglucósidos.

Antibióticos que actúan sobre los ácidos nucleicos

Rifampicina y fluoroquinolona.

Antimetabolitos

Que bloquean pasos metabólicos específicos y esenciales para el microorganismo.

Antibióticos antimicobacterias

Para el tratamiento de la tuberculosis: isoniacida, rifampicina, etambutol, pirazinamida, capreomicina y cicloserina.

Para el tratamiento de la lepra: dapsonas y clofaximina.

Otros antibióticos

Fuente: Torres, 2002.

2.1.5. Antibióticos que actúan sobre la pared celular

Las bacterias poseen una pared celular que les confiere rigidez y resistencia a la lisis osmótica. La síntesis de dicha pared es un proceso complejo en el que intervienen numerosas enzimas y que tiene lugar en diferentes fases. La bacitracina actúa inhibiendo la conversión en su forma activa del lípido transportador de las subunidades del peptidoglucano a través de la membrana celular. La fosfomicina inhibe la síntesis de la

pared bacteriana en su primera fase. Los glucopéptidos se unen al componente terminal D-alanil-D-alanina del pentapéptido impidiendo la transferencia del disacárido pentapéptido al aceptor de la pared celular; además, actúan alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. Los antibióticos β -lactámicos actúan impidiendo la transpeptidación o fase final de formación de la pared bacteriana. Los β -lactámicos se unen a unas proteínas presentes en la membrana plasmática de la bacteria conocidas como proteínas fijadoras de la penicilina o PBP (Penicillin - Binding Proteins), que son enzimas que actúan en la fase final de la síntesis del peptidoglucano, pueden ser transpeptidasas, carboxipeptidasas o endopeptidasas. La mayor parte de los antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular son bactericidas, ejercen su acción cuando la bacteria está en fase de crecimiento activo, dando lugar a la muerte de la bacteria por lisis celular (Suárez *et al.*, 2007).

Entre los antibióticos que actúan sobre la pared celular esta la bacitracina, que por su estructura química es de tipo polipeptídico.

2.1.6. Antibióticos polipeptídicos

Los antibióticos polipeptídicos son un grupo heterogéneo con aspecto variable, que presentan resistencia a la inactivación por enzimas proteolíticas (Granados y Villaverde, 2003). Poseen ciertas similitudes con los antibióticos aminoglucósidos, al igual que ellos no se absorben por vía oral, no atraviesan la barrera hematoencefálica y su espectro abarca a los patógenos Gram negativos. Sin embargo, producen mayor nefrotoxicidad y potencian de forma más eficaz el bloqueo producido por los bloqueantes neuromusculares no despolarizantes que, a diferencia del producido por aminoglucósidos, no revierte con neostigmina y calcio. Su uso clínico es escaso (Torres, 2001).

Tienen potente acción bactericida (Suárez *et al.*, 2007), presentan falta de absorción oral y alto potencial nefrotóxico. Son un grupo heterogéneo por lo que tienen un espectro variable (Granados y Villaverde, 2003). En clínica se usan:

- Polimixina B
- Colistina
- Bacitracina
- Tirotricina (Tripathi, 2008).

Los antibióticos polipeptídicos (bacitracina y polimixina B) solo se utilizan en forma tópica debido a su alto grado de toxicidad sistémica. Estos compuestos difieren entre sí por sus mecanismos de acción y espectros antibacterianos. La bacitracina es eficaz sobre todo contra bacterias Gram positivas e inhibe la síntesis de la pared celular a través de la interferencia de subunidades de peptidoglucanos hacia la pared celular. La polimixina es activa contra bacterias Gram negativas, a través de la ruptura de la membrana citoplasmática bacteriana por un efecto similar al de los detergentes catiónicos (Gennaro, 2003).

La colistina tiene acción preferente sobre Gram negativos, especialmente sobre el género *Pseudomonas*; su uso está reservado a infecciones graves por patógenos resistentes a otros antibióticos. Actúa mediante alteración de la permeabilidad de la membrana, por lo que también resulta tóxico para la célula humana (tejido renal y SNC son los más afectados). Su uso es hospitalario y se administra por vía intravenosa pues no se absorbe bien por otras vías (Betés, 2008).

La tirotricina es una mezcla de gramicidina y tirocidina, obtenidas por *Bacillus brevis*. Es activa contra bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas, actúa sobre la membrana celular causando la filtración de sustancias y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en las bacterias. No se absorbe por vía oral y es demasiado tóxica

para su uso sistémico, causando hemólisis. Se emplea solo en forma tópica; esta vía no provoca sensibilización (Tripathi, 2008)

La eficacia de los antibióticos polipeptídicos, al igual que los otros antibióticos, está limitada contra cepas susceptibles. Debe tenerse en cuenta que el fenómeno de la resistencia antimicrobiana “natural” se favorece por el abuso y mal uso de antibióticos, por lo que se debe sopesar su uso y controlar el mercado de estos fármacos, con la finalidad de tener medicamentos útiles (Mendoza, 2008).

2.2. BACITRACINA

La bacitracina es un antibiótico polipeptídico producido por el crecimiento de un organismo del grupo liqueniformis del *Bacillus subtilis* (Lio y Kaye, 2004). Es activo por vía tópica y parenteral. Está compuesto por 3 componentes: A (más importante), B y C (Figura 1.).

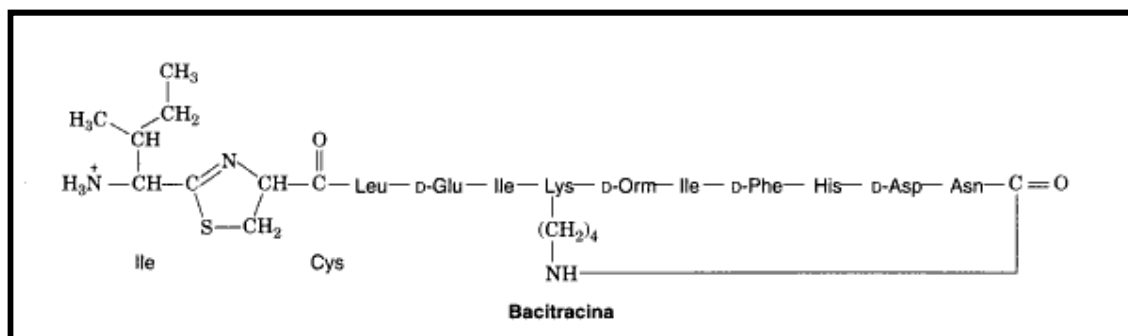


Figura 1. Estructura química de la bacitracina (Voet y Voet, 2006).

Fue descrita inicialmente por Johnson B. y col. en Science, en 1945. Es un antibiótico tópico barato, de uso popular, bajo riesgo de toxicidad y fácilmente disponible. Activa sobre todo frente a bacterias Gram positivas. A menudo se usa asociado a

neomicina y polimixina, que son activas contra bacterias Gram negativas. Se utiliza sobre todo tópicamente en infecciones oftalmológicas o de la piel. No se absorbe vía oral aunque se utiliza en caso de colitis pseudomembranosa por *Clostridium difficile* (Sáenz y Saldaña, 2005).

2.2.1. Descripción

Polvo blanco a amarillo claro, inodoro o con un olor débil, higroscópico, las soluciones se deterioran con rapidez a temperatura ambiente; se precipita en las soluciones y es inactivada por las sales de numerosos metales pesados; las soluciones conservadas en congelación mantienen su potencia durante varias semanas (Gennaro, 2003).

2.2.2. Solubilidad

Completamente soluble en agua, soluble en alcohol, insoluble en cloroformo o éter (Gennaro, 2003).

2.2.3. Mecanismo de acción

La bacitracina forma un complejo con el dolicol – PP inhibe la desfosforilación del fosfolípido que transporta la subunidad de peptidoglucano a través de la membrana celular bacteriana. Con esta acción evita la síntesis de la glucoproteína a partir de precursores de oligosacáridos unidos a lípidos (Voet y Voet, 2006), bloquea la regeneración del lípido transportador e inhibe la síntesis de la pared bacteriana (Sánchez, 2011).

2.2.4. Farmacocinética

No se absorbe de manera significativa en el intestino al ser administrada por vía oral. En heces se recupera de 91,2 a 97,5% de la dosis oral total. El resto puede absorberse y eliminarse por orina. No se debe aplicar por vía parenteral, sin embargo en ensayos experimentales se encontró que administrado por vía intramuscular, el medicamento alcanza concentraciones terapéuticas hasta por seis a ocho horas después de la aplicación. Cerca de 10 a 40% se excreta. En la piel, en preparaciones como colirios u óticas, su absorción puede considerarse nula (Alanís, 2007).

2.2.5. Farmacodinamia

La bacitracina es bactericida con efecto dependiente de la dosis. Su actividad no es afectada por sangre, líquidos orgánicos y detritos celulares. Actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular; produce alteraciones de esta última que hacen a las bacterias más sensibles a la acción de otros antimicrobianos (Alanís, 2007).

2.2.6. Espectro de acción y resistencia

Es bactericida para una gran variedad de bacterias Gram positivas incluyendo cepas resistentes a penicilinas (*Staphylococcus coagulasa* positivos, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Clostridium* y *Corinebacterium*) y algunas bacterias Gram negativas (gonococos, meningococos y *Fusobacterium*) (Thornton *et al.*, 2003a) (Thornton *et al.*, 2003b). También es activa contra especies de *Serpulina* y *Entamoeba histolytica* (Alanís, 2007).

La resistencia es infrecuente pero se ha reportado en algunas cepas de *Staphylococcus* (Thornton *et al.*, 2003a) (Thornton *et al.*, 2003b). No induce resistencia cruzada con otros antibióticos (Alanís, 2007).

2.2.7. Efectos adversos

Aunque los efectos secundarios con la bacitracina son poco probables, puede causar sensibilización al ser usado en úlceras crónicas y el espectro de reacciones puede ir desde una dermatitis eccematosa de contacto hasta urticaria y anafilaxis. La incidencia de alergia a bacitracina por sí misma es baja, aunque se mencionan incidencias variables de reacciones alérgicas del 10% y 13,1% para la bacitracina en comparación al 34% para la neomicina. El riesgo de predisposición de alergia a la bacitracina es por alergia a la neomicina (dermatitis alérgica de contacto). Es rara la hipersensibilidad tardía, la reacción alérgica mediada por Ig E aguda y reacción anafiláctica. El petrolato blanco como vehículo es una alternativa segura y efectiva en pacientes con sensibilización conocida a la bacitracina (Thornton *et al.*, 2003a) (Thornton *et al.*, 2003b) (Lio y Kaye, 2004), tiene riesgos nefrotóxicos, especialmente su uso parenteral; sin embargo, cuando se usa en zonas extensas, como quemaduras, heridas profundas o picaduras de animales se favorece su absorción con el consiguiente riesgo de nefrotoxicidad, los niños son menos susceptibles que los adolescentes a estos efectos tóxicos. La bacitracina está clasificada dentro de la categoría C de riesgo para el embarazo. El uso prolongado puede favorecer las infecciones por hongos. Se ha descrito prurito anal y erupción cutánea (Sáenz y Saldaña, 2005).

2.2.8. Usos

La bacitracina comúnmente se combina con otros antibióticos poco absorbibles y con actividad contra Gram negativos para aplicación tópica (Alanís, 2007).

La bacitracina tópica es eficaz para el tratamiento de las siguientes infecciones cutáneas provocadas por microorganismos sensibles al antibiótico: impétigo contagioso, foliculitis, piodermitis, ectima, furunculosis, úlceras por decúbito, dermatitis eccematoide infecciosa, sarna y dermatofitias. Se utilizaba en el tratamiento de infecciones oftálmica. Para el tratamiento tópico a menudo se prefiere la sal de zinc y esta es la forma incorporada con más frecuencia en las combinaciones comerciales. La bacitracina por lo general se combina con neomicina y sulfato de polimixina B. El desarrollo de resistencia es mucho menos frecuente y más lento para la bacitracina que para la penicilina; muchos microorganismos no desarrollan resistencia (Gennaro, 2003).

En oftalmología, la bacitracina es eficaz contra la mayoría de los organismos Grampositivos y algunos Gramnegativos, incluyendo los estafilococos productores de penicilinasa y especies de *Neisseria*, *Haemophilus* y *Actinomyces*; penetra escasamente en una cornea intacta, pero su penetración se incrementa ante un defecto epitelial de aquella (Garg *et al.*, 2010).

Se le utiliza como antibiótico profiláctico adicionado en el alimento contra enteritis y disentería porcina. Así mismo, es capaz de evitar la enteritis crónica necrótica por *Clostridium perfringens* tipo A cuando se añade bacitracina zinc al agua de bebida, disminuye la resistencia de *Escherichia coli* a otros antimicrobianos y al alimentar cerdos con dietas suplementadas con bacitracina metilendisilisilato se abate la gravedad de las diarreas producidas por *Serpulina hyodysenteriae*. Su nula absorción gastrointestinal y su escasa inducción a la resistencia bacteriana, son características que han señalado a bacitracina como un promotor de crecimiento ideal. El efecto estimulante del crecimiento

de la bacitracina se atribuye a que adelgaza las paredes del intestino, por lo que se facilita la absorción de nutrientes. No tiene efecto sobre la energía digerible del alimento (Alanís, 2007).

2.3. *Micrococcus luteus*

2.3.1. Clasificación científica

Según el manual de Bergey, 2012:

Dominio : Bacteria

Phylum : *Actinobacteria*

Clase : *Actinobacteria*

Orden : *Micrococcales*

Familia : *Micrococcaceae*

Género : *Micrococcus*

Especie : *Micrococcus luteus*

2.3.2. Características

Es una bacteria Gram positiva de forma esférica, saprófito y aerobio obligado. Se encuentra en ambientes diversos (suelo, polvo, agua, aire) y como parte de la flora normal de la piel de mamíferos. Coloniza también en las mucosas de la boca y en la parte superior del tracto respiratorio de los humanos. Se ha aislado de animales, productos lácteos y de cerveza. Tolerancia a ambientes secos y altas concentraciones de sal, pero no puede sobrevivir mucho tiempo en el suelo. Forma colonias de color amarillo pálido al

crecer en medios de cultivo nutritivos. Se ha demostrado que sobrevive en ambientes oligotróficos por largos periodos de tiempo (Sciencenet Multimedia Publishing, 2003).

2.3.3. Bioquímica

Micrococcus luteus produce pigmentos insolubles en agua de amarillo crema, puede crecer sobre agar de nitrógeno inorgánico y pocos pueden reducir nitrato. Son oxidasa positivo, no producen ácido a partir de glucosa o glicerina bajo condiciones aeróbicas y no producen arginina hidrolasa o galactosidasa. Los carbohidratos son oxidados a CO₂ y agua. Son coagulasa negativos y susceptibles a la bacitracina (Sciencenet Multimedia Publishing, 2003).

2.3.4. Patogénesis

Puede generar infecciones intestinales e infecciones extraintestinales. *M. luteus* no se considera específicamente como un microorganismo patógeno, pero es visto como patógeno oportunista asociado particularmente con pacientes inmunocomprometidos. Se han reportado infecciones del tracto urinario (Sciencenet Multimedia Publishing, 2003).

2.3.5. Usos industriales

Mientras algunas especies de *Micrococcus* son utilizadas para el mejoramiento del sabor y olor de productos cárnicos fermentados, *M. luteus* ha sido usado en la producción de hidrocarburos alifáticos de cadenas largas (C21 - C34). Éstos podrían ser útiles como aceites de lubricación y poder ser sustitutos de productos del petróleo (Sciencenet Multimedia Publishing, 2003).

2.4. VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS ANTIBIÓTICOS

2.4.1. Introducción

La potencia de un antibiótico se estima mediante la comparación de la actividad de un producto (problema) y la de una sustancia de referencia (patrón) en presencia de un microorganismo testigo (AEFI, 2001).

Bajo las condiciones adecuadas, la actividad (potencia) de los antibióticos puede demostrarse por su efecto inhibidor sobre los microorganismos. La reducción en la actividad antimicrobiana también revela cambios sutiles no comprobables mediante métodos químicos. En consecuencia, las valoraciones microbiológicas o biológicas siguen siendo, por lo general, el estándar para disipar dudas en cuanto a la posible pérdida de actividad (USP 34, 2011).

2.4.2. Métodos

Se utilizan dos métodos generales: la valoración en cilindro-placa o “en placa” y la valoración turbidimétrica o “en tubo” (USP 34, 2011), dependiendo de la naturaleza de la muestra a ensayar (AEFI, 2001).

A. Método de cilindro placa

Se basa en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical a través de una capa de agar solidificada en un plato o placa de Petri hasta inhibir totalmente el crecimiento del microorganismo añadido, en un área circular o “zona de inhibición” en torno al cilindro que contiene una solución del antibiótico (USP

34, 2011). La base de los ensayos por difusión en agar, es que la respuesta obtenida frente a distintas dosis de antibiótico sean proporcionales a los diámetros de los halos de inhibición (AEFI, 2001).

B. Método turbidimétrico

Se basa en la inhibición del crecimiento de un cultivo microbiano en una solución uniforme del antibiótico en un medio líquido que promueva su rápido crecimiento en ausencia del antibiótico (USP 34, 2011). En los ensayos turbidimétricos la respuesta se mide en forma de turbidez (AEFI, 2001).

2.4.3. Definiciones

- *Potencia real o verdadera.* La potencia de la materia o producto acabado cuando se realiza el ensayo.
- *Potencia asignada.* Es el valor nominal asignado a un producto acabado a partir de la potencia de la materia prima.
- *Potencia estimada.* Potencia calculada a partir de los datos de ensayo.
- *Limites de confianza (intervalo de confianza).* La farmacopea aplica como intervalo de confianza el que se calcula con probabilidad del 95% sobre el valor real obtenido, no obstante, se pueden calcular con otro nivel de probabilidad (AEFI, 2001).

2.4.4. Factores determinantes

La buena ejecución del método depende de que los siguientes factores sean los apropiados y estén bien controlados.

- Microorganismo
- Agar o medio de cultivo.
- pH
- Diámetro de los pocillos o discos (difusión en agar)
- Espectrofotómetro calibrado (turbidimetría)
- Rango de concentraciones
- Temperatura de incubación de las placas o tubos
- Soluciones buffer (AEFI, 2001).

2.5. VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA BACITRACINA

Según la farmacopea vigente, se tienen en cuenta las siguientes consideraciones:

2.5.1. Aparato

Todos los equipos deben limpiarse antes y después de cada uso. Los elementos de vidrio utilizados para conservar y transferir los organismos de prueba se esterilizan con calor seco o con vapor (USP 34, 2011).

2.5.2. Control de temperatura

Se requiere control termostático en varias etapas de una valoración microbiológica: durante el cultivo de un microorganismo y la preparación del inóculo, así como durante la incubación en placa. Mantener la temperatura de las placas de valoración a $\pm 0,5^\circ$ de la temperatura seleccionada (USP 34, 2011).

2.5.3. Espectrofotometría

Puede utilizarse la medición de la absorbancia o transmitancia para preparar los inóculos (USP 34, 2011).

2.5.4. Receptáculos de valoración en cilindro - placa

Para las placas de valoración, utilizar placas de Petri de vidrio o plástico (aproximadamente 20 x 100mm) con cubiertas de un material adecuado. Para los cilindros de valoración, utilizar cilindros de acero inoxidable o porcelana con las siguientes dimensiones, cada una de las cuales tiene una tolerancia de $\pm 0,1\text{mm}$: diámetro externo 8mm; diámetro interno 6mm y longitud 10mm. Limpiar con cuidado los cilindros para eliminar todos los residuos. Ocasionalmente se requiere una limpieza con un baño ácido con ácido nítrico 2N o con ácido crómico (USP 34, 2011).

2.5.5. Medio y diluyente

A. Medio

El medio requerido para la preparación del inóculo del microorganismo de prueba está hecho con los ingredientes mencionados en la Tabla 3. Podrá utilizarse ligeras modificaciones de los ingredientes individuales, o el medio deshidratado reconstituido, siempre y cuando el medio resultante posea las mismas propiedades de promoción de crecimiento o superiores y produzca una curva de respuesta estándar similar (USP 34, 2011).

Disolver los ingredientes en agua para hacer 1L y ajustar la solución con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N, según sea necesario, para obtener el pH especificado después de la esterilización con vapor (USP 34, 2011).

Tabla 3. Composición del Medio 1

Ingredientes	Cantidad (g/L)
Peptona	6,0
Digerido pancreático de caseína	4,0
Extracto de levadura	3,0
Extracto de carne	1,5
Dextrosa	1,0
Agar	15,0
Agua	1000mL

pH después de la esterilización: $6,6 \pm 0,1$.

Fuente: USP 34, 2011

B. Solución amortiguadora de fosfato

Preparar la solución amortiguadora de fosfato de potasio requerida para el antibiótico en análisis de la siguiente manera, o por otros medios adecuados. La solución amortiguadora se esteriliza después de su preparación y el pH especificado en este caso corresponde al pH después de la esterilización (USP 34, 2011).

Solucion amortiguadora N°1, 1 por ciento, pH 6,0.- Disolver 2,0g de fosfato dibásico de potasio y 8,0g de fosfato monobásico de potasio en 1000mL de agua. Ajustar el pH con ácido fosfórico 18N o hidróxido de potasio 10N a $6,0 \pm 0,05$ (USP 34, 2011).

2.5.6. Unidades y estándares de referencia

La potencia de los antibióticos esta especificada en “unidades” o “ μg ” de actividad. En cada caso la “unidad” o “ μg ” de actividad del antibiótico se establece y define según el estándar maestro federal designado para dicho antibiótico. El estándar de referencia USP correspondiente se calibra según el estándar maestro. Los estándares de referencia USP para sustancias antibióticas son conservados y distribuidos por U.S. Pharmacopeial Convention, Inc (USP 34, 2011).

El concepto de “ μg ” de actividad se originó en un caso en que se consideró que la preparación antibiótica seleccionada como estándar de referencia consistía totalmente en una sola entidad química y, por lo tanto, se le asignó una potencia de 1000 “ μg ” por mg. En varios casos de este tipo, como resultado del desarrollo de métodos de fabricación y purificación para antibióticos particulares, se obtuvieron preparaciones que contenían más de 1000 “ μg ” de actividad por mg. Luego se comprendió que dichas preparaciones tenían

una actividad equivalente a un número de “µg” determinado del estándar de referencia original. En la mayoría de los casos, no obstante, los “µg” de actividad equivalen exactamente a los µg (peso) de la sustancia pura (USP 34, 2011).

En algunos casos surgen complicaciones, por ejemplo, cuando un antibiótico existe como base libre y en forma salina, y los “µg” de actividad se han definido en términos de una sola de dichas formas; cuando la sustancia antibiótica consta de un número de componentes muy similares químicamente pero con diferente actividad antibiótica o cuando las potencias de una familia de antibióticos se expresan en términos de un estándar de referencia que consta de un solo miembro que, no obstante, podría ser heterogéneo. En dichos casos, los “µg” de actividad definidos en términos de un “Estándar Maestro” equivalen a una “Unidad”. Por consiguiente, no debería suponerse que los “µg” de actividad corresponden necesariamente a los µg (peso) de la sustancia antibiótica (USP 34, 2011).

2.5.7. Preparación del estándar

Para preparar una solución madre, disolver una cantidad del estándar de referencia USP de un determinado antibiótico, pesado con exactitud, o todo el contenido de un vial de estándar de referencia USP, cuando corresponda, en el disolvente que corresponda y luego diluir hasta la concentración requerida según se indique. Conservar en un refrigerador y usar dentro del periodo indicado. El día de la valoración, preparar a partir de la solución madre cinco o más diluciones, por lo general, con una diferencia de concentración entre diluciones sucesivas en una proporción de 1:1,25 para el caso de una valoración cilindro-placa. Utilizar el diluyente final especificado y una secuencia tal que la dilución media tenga la concentración especificada (USP 34, 2011).

2.5.8. Preparación de la muestra

A partir de la información disponible para la preparación que se ha de valorar (la “muestra desconocida”), asignarle a esta una potencia supuesta por unidad de peso o volumen y, sobre esta suposición, preparar el día de la valoración una solución madre y una dilución de prueba según se especifica para cada antibiótico pero con el mismo diluyente final utilizado para el estándar de referencia USP. La valoración con cinco niveles del estándar requiere un solo nivel de la muestra desconocida a una concentración que se supone igual al nivel medio del estándar (USP 34, 2011).

2.5.9. Organismo e inóculo

A. Organismo de prueba

El organismo de prueba para el antibiótico bacitracina se indica en la tabla 4, junto con su número de identificación en la American Type Culture Collection “ATCC” (colección de cultivos tipo de los EE.UU.) Se indica el método de valoración para el antibiótico bacitracina en la tabla 5. Mantener un cultivo sobre medio inclinado y bajo las condiciones de incubación especificadas en la Tabla 6, y transferir semanalmente a un nuevo tubo con medio inclinado (USP 34, 2011).

B. Preparación del inóculo

Antes de realizar una valoración, retirar el cultivo de una pendiente o cultivo reciente del organismo, con 3mL de solución salina estéril y perlas de vidrio

estériles. Inocular la superficie de 250mL del medio agar especificado para ese microorganismo en la tabla 6 y que se halla en el lado plano de un frasco Roux. Esparcir la suspensión en forma pareja sobre la superficie del agar con ayuda de perlas de vidrio estériles e incubar a la temperatura indicada durante aproximadamente el tiempo señalado. Una vez finalizado este tiempo, preparar la suspensión madre recogiendo el cultivo de la superficie en 50mL de solución salina estéril. Determinar mediante pruebas la cantidad de suspensión madre que se debe utilizar como inóculo, comenzando con el volumen sugerido en la tabla 6 (USP 34, 2011).

Para la valoración cilindro-placa, determinar mediante ensayo las proporciones de suspensión madre que se deben incorporar en el inóculo, comenzando con los volúmenes indicados en la tabla 8, que den como resultado una demarcación satisfactoria de zonas de inhibición de aproximadamente 14 a 16mm de diámetro y produzcan una relación de dosis reproducible. Preparar el inóculo añadiendo una porción de suspensión madre a una cantidad suficiente de medio agar derretido y enfriado a 45° a 50°, agitando con rotación moderada para lograr una suspensión homogénea (USP 34, 2011).

Tabla 4. Organismo de prueba para la valoración del antibiótico bacitracina.

Antibiótico	Organismo de Prueba	Número ATCC®
Bacitracina	<i>Micrococcus luteus</i>	10240

Fuente: USP 34, 2011

2.5.10. Procedimiento

A. Diseños de valoración

Las valoraciones microbiológicas aumentan su precisión con la segregación de fuentes relativamente grandes de posibles errores y desviaciones mediante diseños experimentales adecuados. En una valoración en cilindro - placa, las comparaciones esenciales están restringidas a las relaciones entre las mediciones del diámetro de la zona dentro de las placas sin tener en cuenta la variación entre placas en su preparación y posterior manipulación (USP 34, 2011).

El diseño de valoración recomendado es una valoración de un nivel con una curva estándar. Para esta valoración, preparar cinco o más diluciones de prueba del estándar (incluyendo una que corresponda a la concentración de referencia), y una sola solución de un nivel de prueba medio de la muestra desconocida, según lo descrito anteriormente en “preparación del estándar y preparación de la muestra”. Considerar una valoración como preliminar si su potencia computada con cualquiera de los diseños es inferior al 80% o superior al 125% de la potencia supuesta al preparar la solución madre de la muestra desconocida. En dicho caso, ajustar la potencia supuesta según corresponda y repetir la valoración (USP 34, 2011).

Las determinaciones microbiológicas de potencia están sujetas a variables intervaloración e intravaloración, de modo tal que se requieren dos o más valoraciones independientes para obtener una estimación confiable de la potencia de una determinada preparación de valoración o muestra desconocida. Comenzando con soluciones madre preparadas por separado y

diluciones de prueba del estándar y de la muestra desconocida, repetir otro día la valoración de una muestra desconocida dada. Si la potencia estimada de la segunda valoración difiere mucho, según lo indique el error estándar calculado, respecto de la primera, realizar una o más valoraciones adicionales. El resultado combinado de una serie de valoraciones independientes más pequeñas a lo largo de varios días es una estimación más confiable de la potencia que el obtenido de una valoración grande con el mismo número total de placas y tubos (USP 34, 2011).

Tabla 5. Preparación de la solución madre y dilución de prueba del estándar de referencia de bacitracina.

Antibiótico y tipo de valoración [cilindro-placa (CP) o turbidimétrico (T)]	Disolvente inicial	Solución madre final concentración por mL	Usar dentro de	Diluyente final	Dosis media (µg de actividad o unidades por mL)
Bacitracina – cinc (CP)	Ácido clorhídrico 0,01N	100U	Mismo día	Solución amortiguadora N° 1	1,0U

Fuente: USP 34, 2011

Tabla 6. Preparación del inóculo

Organismo de prueba (N° ATCC)	Condiciones de incubación			Composición sugerido del inóculo		Antibiótico valorado
	Medio	Temperatura (°C)	Tiempo	Medio	Cantidad (mL por 100mL)	
<i>Micrococcus luteus</i> (10240)	1	32 a 35	24 horas	1	0,3	bacitracina

Fuente: USP 34, 2011

B. Método de cilindro – placa

Para preparar placas de valoración utilizando placas de Petri, colocar 21 mL de medio N° 2 en cada una de las cantidades de placas requeridas y dejar que se solidifique hasta formar una capa base lisa de profundidad uniforme. Agregar 4mL de inóculo de capa de siembra, preparado según las indicaciones para el antibiótico determinado, inclinando la placa hacia atrás y hacia adelante para esparcir el inóculo uniformemente sobre la superficie y dejar que se endurezca (USP 34, 2011).

Dejar caer seis cilindros de valoración sobre la superficie inoculada desde una altura de 12mm, utilizando una guía mecánica u otro dispositivo para asegurar el espaciado uniforme en un radio 2,8 cm y cubrir las placas para evitar la contaminación. Después de llenar los seis cilindros sobre cada placa con diluciones de antibiótico que contengan los niveles de prueba que se especifican a continuación, incubar las placas a una temperatura de 32 a 35 °C, o a la temperatura especificada, durante 16 a 18 horas, retirar los cilindros, y medir y registrar el diámetro de cada zona de inhibición de crecimiento con una aproximación de 0,1mm (USP 34, 2011).

Para la valoración de un nivel con una curva estándar, preparar diluciones que representen cinco niveles de prueba del estándar y un nivel de prueba único de la muestra desconocida correspondiente al estándar medio de la curva de las cinco soluciones de estándares preparados, según lo definido en “preparación del estándar y preparación de la muestra”. Para derivar la curva estándar, llenar cilindros alternos en cada una de las tres placas con la dilución de la prueba media del estándar y cada uno de los nueve cilindros restantes con una de las otras cuatro diluciones del estándar. Repetir el

proceso para las tres diluciones del estándar. Para cada muestra desconocida, llenar cilindros alternos en cada una de las tres placas con la dilución de prueba media del estándar y cada uno de los nueve cilindros restantes con la dilución de prueba correspondiente de la muestra desconocida (USP 34, 2011).

2.5.11. Cálculo

Para calcular la potencia a partir de los datos obtenidos con el método de cilindro-placa, proceder a partir de una curva estándar, utilizando un método de regresión lineal por mínimos cuadrados y una prueba de linealidad. En aquellos casos en los que se realiza un número de valoraciones del mismo material con la misma curva estándar, calcular el coeficiente de variación en los resultados de todas las valoraciones del material. En aquellos casos en los que se realiza más de una valoración del mismo material con diferentes curvas estándar, promediar los dos o más valores de la potencia (USP 34, 2011).

2.6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

2.6.1. Generalidades

La validación de los procedimientos analíticos usados para la materia prima y el producto acabado están revisados en la guía ICH (1995).

En el caso de que el método analítico esté descrito en farmacopea:

- Si se trata de una materia prima, la validación no será necesaria, aunque se debe efectuar un chequeo de la linealidad, sensibilidad, precisión y selectividad.
- Si se trata de un producto acabado, se deberá efectuar una validación que demuestre que la precisión, selectividad y exactitud son las apropiadas.
- Si no está descrito en farmacopea se debe realizar una validación completa (AEFI, 2001).

2.6.2. Definición

El término validación ha sido definido en la literatura, de diversas maneras y por numerosos autores. Aunque los términos dados son diferentes el significado de las mismas es siempre el mismo:

- especificar e implementar,
- aprobar y
- documentar (AEFI, 2001).

Según la farmacopea vigente (USP 34, 2011), la validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

A. Definición general

Según las Normas de Correcta Fabricación: obtención de pruebas con arreglo a las normas de correcta fabricación, de que cualquier procedimiento,

proceso, equipo, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto (AEFI, 2001).

B. Definición analítica

Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos (AEFI, 2001).

2.6.3. Razones que justifican la validación de métodos analíticos

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizará el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.
- Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las buenas prácticas de laboratorio, con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.
- La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos (AEFI, 2001).

2.6.4. Métodos susceptibles de ser validados

Son validables los métodos analíticos clasificados en la siguiente forma:

- Ensayos de identificación
- Ensayos de límite de impurezas y de cuantificación de impurezas.
- Ensayos para la determinación del analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica (AEFI, 2001; ICH, 1994).
- Ensayos para la determinación de características fármacotécnicas inherentes.
- Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales.
- Ensayos microbiológicos (AEFI, 2001).

2.6.5. Entorno legal

A. Normatividad internacional

Los siguientes documentos exigen la validación de los métodos de ensayo dentro de los laboratorios de control de calidad de las industrias farmacéuticas:

- El Informe 32 del comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas (OMS, 1992).
- Las Normas de Correcta Fabricación (NCF) de medicamentos de la comisión europea (CE, 1999).
- El manual de Buenas Prácticas de Manufactura (Good Manufacturing Practice “GMP”) de los Estados Unidos indica que deben establecerse y

documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados (AEFI, 2001).

Las farmacopeas internacionales: farmacopea europea (EP), farmacopea americana (USP) y la farmacopea británica (BP), diferencian entre validación de métodos de análisis de principios activos y especialidades farmacéuticas.

- *Principios activos de síntesis.* Los métodos oficiales o de farmacopea se consideraran validados siempre y cuando se apliquen a principios activos con la misma ruta de síntesis y por tanto el mismo perfil de impurezas que aquellos para los que fuera redactada la Monografía.
- *Especialidades.* No es recomendable considerar ningún método oficial o de farmacopea totalmente validado para una especialidad, puesto que difícilmente tendrá los mismos componentes ni la misma proporción (AEFI, 2001).

B. Normatividad nacional

- El manual de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) de productos farmacéuticos de la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID, 1999) del Ministerio de Salud, exige la validación de los métodos de ensayo dentro de los laboratorios de control de calidad de las industrias farmacéuticas nacionales.
- La Norma Técnica Peruana (NTP-ISO/IEC 17025, 2006) requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, deja en claro que los laboratorios deben validar los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para

confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto.

- La Ley General de Salud (Ley N° 26842, 2009) señala que si la técnica analítica no corresponde a ninguna de las farmacopeas de referencia, el fabricante debe presentar los documentos que acrediten la validación de las técnicas analíticas propias.
- La Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios (Ley N° 29459, 2010), indica que si la técnica analítica no corresponde a ninguna de las farmacopeas de referencia, el interesado debe presentar los documentos que acrediten la validación de las técnicas analíticas propias del producto terminado.
- El reglamento para el registro, control y vigilancia sanitaria de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios, 2011; exige que si la técnica analítica del producto terminado difiere o no se encuentra en ninguna de las farmacopeas de referencia, el interesado debe presentar los documentos que acrediten la validación de las técnicas analíticas propias emitidas por el fabricante de la forma farmacéutica.

2.6.6. Fases en el desarrollo de un método analítico y criterios de validación

No existe una guía oficial que indique la óptima secuencia de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende del método

en sí mismo. No obstante, el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases:

- *Definición de las características de practicidad.* Han de evaluarse los parámetros de practicidad del método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, costo, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.
- *Estudios de estabilidad de la muestra preparada para análisis.* La estabilidad de las disoluciones de la muestra, después de su preparación según el método de análisis, debe ser evaluada de acuerdo al tiempo requerido para su realización.
- *Características de idoneidad.* Incluye desde los primeros estudios de tanteo con patrones, hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.
- *Características de fiabilidad.* Esta última etapa permitirá conocer las características de fiabilidad del método para su aplicación rutinaria. Dichas características son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.

Las características de fiabilidad comprenden los cinco criterios fundamentales de validación, (no necesariamente aplicables en todos los casos) y de los que derivan en la práctica todos los parámetros de validación:

- a) La capacidad de un método para determinar el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación, excipientes u otras sustancias presentes en la muestra, se relaciona con el término selectividad.

Selectividad: capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca,

en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

- b) La proporcionalidad entre concentración del analito y respuesta del instrumento. Este concepto se relaciona con los términos linealidad y rango.

Linealidad: se define como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Rango: se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior para las cuales se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método.

- c) La dispersión de una serie de resultados alrededor del valor medio o central, es decir, el “más – menos” de un procedimiento analítico se relaciona con el término precisión.

Precisión: es la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí. Se puede estudiar a tres niveles:

Repetibilidad: evalúa la precisión del método (precisión intraensayo).

Precisión intermedia: Evalúa la precisión frente a variaciones de analista, equipo y día (precisión intralaboratorio o precisión interensayo).

Reproducibilidad: evalúa la precisión entre laboratorios (precisión interlaboratorios).

- d) La diferencia entre el valor hallado en el análisis y el valor verdadero. Concepto relacionado con el término exactitud.

Exactitud: expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o valor de referencia y el valor experimentalmente encontrado.

- e) La cantidad mínima de analito requerida para obtener un resultado significativo está relacionada con los términos: límite de detección y límite de cuantificación.

Límite de cuantificación: se define como la mínima cantidad de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión. Este parámetro tiene sentido y especial interés en la determinación de concentraciones bajas de analito.

Límite de detección: se define como la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado aunque no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud.

El hecho de que sea necesario evaluar unos u otros parámetros dependerá básicamente del tipo de ensayo (AEFI, 2001).

2.6.7. Datos requeridos para la validación

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. A continuación se describen las categorías de prueba más habituales para las que se exigen datos de validación:

Categoría I. Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II. Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

Categoría III. Procedimientos analíticos para la determinación de las características desempeño (p.ej. disolución, liberación de fármacos, etc.).

Categoría IV. Pruebas de identificación.

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica. En la Tabla 7 se indican los datos que se requieren para cada una de estas categorías (USP 34, 2011).

Tabla 7. Datos Requeridos para la validación.

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Pruebas de límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	*	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

*Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Fuente: USP 34, 2011.

2.7. VALIDACIÓN: VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS

El ensayo debe diseñarse de tal forma que permita examinar la validez del método matemático en el que se basa la ecuación de la potencia. Si se escoge el modelo de líneas paralelas, las dos líneas de logaritmos de dosis - respuesta deben ser paralelas, y lineales en el rango de dosis usadas en el cálculo. Estas condiciones deben verificarse por ensayos de validación con una probabilidad $P= 0,05$. Pueden usarse otros modelos matemáticos si se demuestra su validez (AEFI, 2001).

Según los datos requeridos para la validación, la valoración microbiológica de los antibióticos está considerada en la categoría I como un procedimiento analítico para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados. Por lo cual, las características de desempeño analítico del método son: linealidad, exactitud, precisión, especificidad e intervalo (USP 34, 2011).

2.7.1. Linealidad

A. Definición

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, proporcionales a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. En algunos casos, para lograr la linealidad, puede ser necesario transformar la concentración y/o la medida. Las transformaciones posibles pueden incluir el logaritmo, la raíz cuadrada, o el recíproco, aunque otras transformaciones son aceptables. Si no

se puede lograr la linealidad, se puede utilizar un modelo no lineal. El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de concentración en función de la respuesta, ya sea lineal o no lineal (USP 34, 2011).

B. Determinación de linealidad

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales en función de la concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (p.ej., mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales. La guía ICH (International Conference on Harmonisation) recomienda que para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones (USP 34, 2011) y pesadas independientes para eliminar el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones (AEFI, 2001).

2.7.2. Exactitud

A. Definición

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo (USP 34, 2011). Según la guía ICH la exactitud debe ensayarse en métodos de análisis para la valoración en materia prima y en producto acabado y en métodos de análisis de cuantificación de impurezas (AEFI, 2001).

B. Determinación de exactitud

En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un analito de pureza conocida (p.ej., un estándar de referencia), o comparando los resultados del procedimiento con los de un segundo procedimiento caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del procedimiento. Si no resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del analito al producto farmacéutico ("spike") como la

comparación de los resultados con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud haya sido comprobada o definida (USP 34, 2011).

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida del analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza (USP 34, 2011).

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración) (USP 34, 2011).

La evaluación de la exactitud puede efectuarse de varias maneras, incluyendo la evaluación de la recuperación del analito (porcentaje de recuperación) en todo el intervalo de la valoración, o evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales. El criterio estadístico de preferencia es que el intervalo de confianza para la pendiente este comprendido dentro de un intervalo alrededor de 1,0; o alternatively, que el valor de la pendiente sea cercano a 1,0. En ambos casos, el intervalo o la definición de cercanía deberían especificarse en el protocolo de validación. El criterio de aceptación dependerá de la valoración, de su variabilidad, y del producto. No es aceptable establecer un criterio de aceptación basado en la falta de significancia estadística para la hipótesis nula de que la pendiente es 1,0 (USP 34, 2011).

2.7.3. Precisión

A. Definición

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una manera homogénea (USP 34, 2011).

La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo corto por el mismo analista con el mismo equipo (USP 34, 2011).

Según la guía ICH el estudio de la precisión se debe realizar únicamente para la determinación cuantitativa de principios activos y cuantificación de impurezas (AEFI, 2001).

B. Determinación de precisión

La precisión de un procedimiento analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita

calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los análisis en este contexto son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta el resultado final de las pruebas (USP 34, 2011).

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración) o usando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba (USP 34, 2011).

2.7.4. Especificidad

A. Definición

Los documentos ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios.

Para las valoraciones, la especificidad proporciona un resultado exacto, que permite una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra (USP 34, 2011).

B. Determinación de especificidad

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, ésto puede hacerse agregando al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas a concentraciones adecuadas y demostrando que el resultado del análisis no resulta afectado por la presencia de estos materiales extraños (USP 34, 2011).

2.7.5. Intervalo

A. Definición

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento analítico (USP 34, 2011).

B. Determinación de intervalo

El intervalo del procedimiento se valida verificando que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se

aplica a muestras con que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo. La ICH recomienda que, para la valoración de un fármaco (o de un producto terminado) se consideren los intervalos especificados mínimos de 80% a 120% de la concentración de prueba (USP 34, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Validar el método analítico microbiológico para determinar la actividad *in vitro* (potencia) del antibiótico bacitracina 50 000 UI/100g en productos farmacéuticos terminados, demostrando, mediante evidencia documentada, que cumple en forma consistente y repetitiva las especificaciones establecidas, proporcionando resultados confiables.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar un método analítico microbiológico que permita cuantificar la actividad (potencia) del antibiótico bacitracina 50 000 UI/100g en un producto terminado.
- Diseñar el protocolo de validación, para llevar a cabo el método de valoración (potencia) o actividad del antibiótico bacitracina 50 000 UI/100g en un producto terminado, basándose en la metodología USP (United States Pharmacopoeia) vigente, de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) y según los recursos con que cuenta la empresa.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- *Micrococcus luteus* ATCC® 10240

Marca: Microbiologics

Pasaje de referencia: 4 (cuarto)

4.2. MUESTRA Y ANTIBIÓTICOS

- Producto terminado: neomicina 350mg + polimixina B 500 000 UI + bacitracina 50 000UI/100g ungüento.
- Bacitracina (estándar secundario de referencia): potencia 75.9 UI/mg (tal cual)
- Placebo (neomicina 350mg + polimixina B 500 000UI y excipientes).

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Preparación de la cepa

Dos días antes a la ejecución del ensayo, se repicó la cepa *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (USP 34, 2011) en un tubo de ensayo conteniendo 10mL de caldo CASO (Anexo 1) (Gutiérrez y Núñez, 2011). Se incubó el tubo en la estufa a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para verificar el crecimiento bacteriano (USP 34, 2011).

Se repicó la cepa *Micrococcus luteus* ATCC 10240 en un tubo inclinado con agar antibiótico N° 11 (Anexo 1) (Gutiérrez y Núñez, 2011), llevado a pH 6,5 con HCl1N. Se incubó el tubo en la estufa a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas y se observó el crecimiento bacteriano (USP 34 modificada, 2011).

4.3.2. Preparación del inóculo

Se procedió a obtener una suspensión de la cepa *Micrococcus luteus* ATCC 10240, añadiendo 5mL de solución salina estéril en el tubo con agar antibiótico N°11 pH 6,5 inclinado conteniendo la cepa. Se agregó 3 perlas de vidrio estériles para el rápido desprendimiento del cultivo (USP 34 modificada, 2011).

Se añadieron gotas de la suspensión concentrada a un frasco con 30 mL de suero fisiológico estéril, se trasvasó previa agitación a una celda la cantidad necesaria para realizar las lecturas en el espectrofotómetro (USP 34 modificada, 2011). Se realizaron las lecturas de transmitancia a $48\% \pm 3\%$ a las siguientes longitudes de onda: 242nm, 244nm y 246nm (Gutiérrez y Núñez, 2011).

4.3.3. Preparación de placas de Petri de valoración

Se licuaron completamente frascos conteniendo 100 mL de agar antibiótico N° 11 pH 6,5 en baño hirviente, manteniéndose luego a una temperatura de 45 a 50 °C aproximadamente (USP 34, 2011). En la cabina de flujo laminar, se añadió el inóculo al medio a razón de 1:100 (1mL de inóculo por cada 100mL de agar antibiótico N° 11 pH 6,5 estéril) (USP 34 modificada, 2011).

Se homogenizó el agar inoculado con la suspensión de la cepa, sin levantar burbujas. Se repartió el medio antibiótico con el inóculo en las placas de Petri a razón de 25mL en cada placa, se dejó solidificar y reposar a temperatura ambiente por una hora (Gutiérrez y Núñez, 2011).

Con el empleo de un molde se realizó excavaciones con un sacabocado N° 4 (8mm de diámetro) en las placas que contienen el medio antibiótico de modo que en cada placa se realizaron seis orificios. Se retiró el agar pre - cortado con una aguja hipodérmica estéril, depositando los residuos en una placa estéril para su posterior eliminación. Se rotuló cada placa y se añadió 30µL de las diluciones del antibiótico de la muestra y del estándar tal como se muestra en la Figura 3 (Gutiérrez y Núñez, 2011).

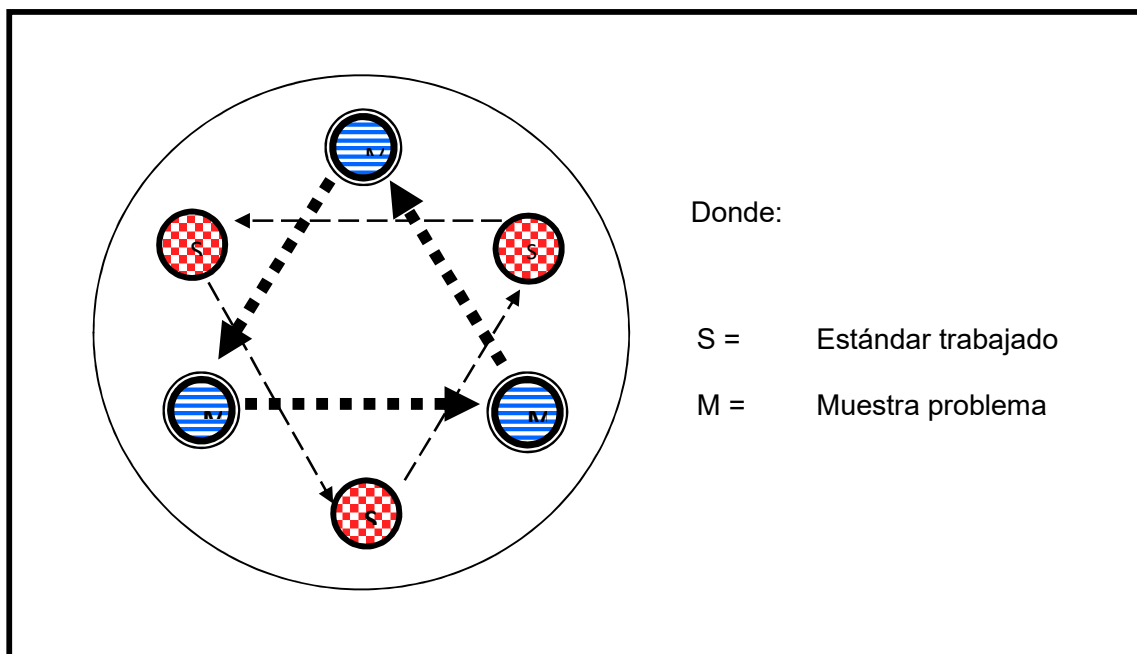


Figura 2. Modo de distribución del estándar y de la muestra en una placa de Petri (Gutiérrez y Núñez, 2011).

Como control positivo, se le añadió a una placa de Petri 25mL el agar inoculado con la suspensión de la cepa, para verificar el crecimiento de los microorganismos (Gutiérrez y Núñez, 2011).

Se dejó las placas en reposo por una hora y luego se las incubó a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ de 24 a 48 horas. Se realizó la medición de los halos de inhibición formados (USP 34 modificada, 2011).

4.3.4. Preparación del estándar (St) y de la muestra (M)

A. Estándar (St)

- *Solución madre o solución stock:* Se pesó 13,2 mg del estándar de referencia secundario de bacitracina (cantidad equivalente a 1000 UI de

bacitracina base) y se diluyó en una fiola de 100 mL enrasando luego con HCl 0,01 N (USP 34 modificada, 2011).

- *Concentración de trabajo:* De esta solución se tomó 2 mL y se diluyó en una fiola de 50 mL, enrasando luego con solución amortiguadora N° 1, se procedió a homogenizar. La concentración final fue de 0,4 UI de bacitracina por mL (USP 34 modificada, 2011).

B. Muestra (M)

Con una espátula estéril, se pesó 2 g de muestra (equivalente a 1000 UI de bacitracina base), y se colocó en una pera de decantación. Se realizó la extracción añadiendo a la pera 50 mL del reactivo controlado éter dietílico y 50 mL de HCl 0,01N. Se agitó fuertemente por 10 minutos y se dejó en reposo por 15 minutos aproximadamente. Se recogió la fracción acuosa en una fiola de 100mL. Se enrasó la fiola con HCl 0,01N, de esta solución se tomó 2mL y se diluyó en una fiola de 50 mL aforando con solución amortiguadora N° 1, obteniéndose la muestra a ser analizada (USP 34 modificada, 2011).

4.3.5. Proceso de validación: parámetros a evaluar.

A. Linealidad

Se preparó una curva de calibración a partir de la solución madre en un intervalo de concentración que incluyó cinco niveles de concentraciones diferentes del antibiótico en progresión geométrica tanto del estándar secundario de referencia como de la muestra problema (producto terminado).

El análisis de cada concentración se realizó en dos placas por triplicado. Las concentraciones del estándar y de las muestras fueron enfrentadas cada una con su respectiva concentración (USP 34, 2011).

- *Para el Estándar.* A partir de la solución madre o stock se prepararon cinco puntos de estándares en fioas de 50mL y se aforó con solución amortiguadora N°1.

Estándar N° 1: 1,3mL [0,26UI/mL]

Estándar N° 2: 1,6mL [0,32UI/mL]

Estándar N° 3: 2,0mL [0,40UI/mL]

Estándar N° 4: 2,5mL [0,50UI/mL]

Estándar N° 5: 3,1mL [0,62UI/mL]

- *Para la muestra.* Habiendo realizado la extracción (detallada en el punto 4.3.4. “preparación de la muestra”), se prepararon cinco puntos de muestras en fioas de 50mL y se aforó con solución amortiguadora N°1.

Muestra N° 1: 1,3mL [0,26UI/mL]

Muestra N° 2: 1,6mL [0,33UI/mL]

Muestra N° 3: 2,0mL [0,41UI/mL]

Muestra N° 4: 2,5mL [0,51UI/mL]

Muestra N° 5: 3,1mL [0,63UI/mL]

(Cálculos en el anexo 2).

Las muestras se analizaron en sentido creciente de concentración, para minimizar posibles errores en el análisis y se realizaron pesadas independientes, eliminando así el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones (AEFI, 2001).

B. Exactitud

Para la evaluación de este parámetro se utilizó el método del placebo cargado, el cual es utilizado para productos terminados. Se preparó un placebo conteniendo todos los ingredientes excepto el antibiótico a determinar (AEFI, 2001).

Se prepararon tres muestras de tres determinaciones repetidas de cada concentración. La exactitud se llevó a cabo añadiendo una concentración conocida de analito al placebo, las muestras se trabajaron al 90% (límite inferior de aceptación), 100% y 120% (límite superior de aceptación). Los pesos de principio activo y placebo para cada nivel porcentual fueron diferentes (USP 34, 2011).

- *Para el estándar.* Se preparó según lo detallado en el punto 4.3.4. “preparación del estándar”. Ésta única concentración fue comparada con las muestras al 90%, 100% y 120%.

- *Para la muestra:*

Exactitud al 90%: se pesó 11,9 mg del estándar de referencia secundario de bacitracina (equivalente a 900UI de bacitracina base) y se colocó en una pera de decantación añadiendo 2 g del placebo. Se realizó la extracción (detallada en el punto 4.3.4. “preparación de la muestra”) y se enfrentó la muestra (90%) y el estándar (100%) en dos placas por triplicado.

Exactitud al 100%: se pesó 13,2 mg del estándar de referencia secundario de bacitracina (equivalente a 1000UI de bacitracina base) y se colocó en una pera de decantación añadiendo 2 g del placebo. Se realizó la extracción (detallada en el punto 4.3.4. “preparación de

la muestra”) y se enfrentó la muestra (100%) y el estándar (100%) en dos placas por triplicado.

Exactitud al 120%: se pesó 15,9 mg del estándar de referencia secundario de bacitracina (equivalente a 1200UI de bacitracina base) y se colocó en una pera de decantación añadiendo 2 g del placebo. Se realizó la extracción (detallada en el punto 4.3.4. “preparación de la muestra”) y se enfrentó la muestra (120%) y el estándar (100%) en dos placas por triplicado.

(Cálculos en el anexo 3v).

C. Precisión

- **Repetibilidad:** se aplicó el método utilizando productos terminados a una concentración del 100% (50 000UI de bacitracina en 100 g de producto terminado). Se seleccionó al azar nueve muestras de productos terminados que contenían al analito en investigación y se prepararon las muestras para el ensayo procediendo según lo descrito en el punto 4.3.4. “preparación del estándar y de la muestra”, por el mismo analista, con los mismos equipos y en el mismo laboratorio por un periodo corto de tiempo (USP 34, 2011).
(Cálculos en el anexo 4).
- **Precisión intermedia:** se analizaron nueve muestras al azar a una concentración del 100% (50 000UI de bacitracina en 100 g de producto terminado). Las muestras fueron preparadas según lo descrito en el punto 4.3.4. “preparación del estándar y de la muestra” por una analista diferente, en días diferentes pero en el mismo laboratorio (USP 34, 2011).

Cada una de las nueve muestras se trabajaron en dos placas por triplicado, cada muestra con su respectivo estándar.

(Cálculos en el anexo 5).

La precisión intermedia del método, se efectuó sobre una serie de muestras que fueron analizadas independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) con los mismos instrumentos pero con distintos analistas y en días diferentes (AEFI, 2001).

D. Especificidad

- **Estándar:** se preparó según lo señalado en el punto 4.3.4. “preparación del estándar”. Se comparó con el placebo y el blanco (USP 34, 2011).
- **Placebo:** se pesó 2 g del placebo y se procedió según lo señalado en el punto 4.3.4. “preparación de la muestra” (USP 34, 2011).
- **Blanco:** sin muestra y sin placebo, la extracción sólo se realizó a base de éter dietílico y HCL 0,01N y se procedió según lo señalado en el punto 4.3.4. “preparación de la muestra” (USP 34, 2011).

Se realizó el análisis en dos placas por triplicado para cada uno.

(Cálculos en el anexo 6).

E. Intervalo

Se verificó si el procedimiento analítico proporcionaba linealidad, exactitud y precisión aceptables, es decir si cumplían con los criterios de aceptación especificados.

4.3.6. Análisis de datos: criterios de aceptación.

Según el manual de Validación de Métodos Analíticos de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria del 2001, los criterios de aceptación para cada parámetro estudiado son:

A. Linealidad

- Coeficiente de correlación (r): $\geq 0,98$
- Coeficiente de determinación (r^2): $\geq 0,95$
- Cumplimiento de las condiciones de aceptación:
 - Normalidad de los residuales
 - Homocedasticidad de los residuales
- Análisis de la varianza:
 - Test F_1 para la regresión lineal o pendiente. $p < 0,05$ (significativo)
 - Test F_2 para la linealidad, falta de ajuste o curvatura. $p > 0,05$ (no significativo)
- Test de coincidencia o bien de paralelismo: $p > 0,05$ (no significativo)

B. Exactitud

- Homogeneidad de varianzas: $p > 0,05$ (no significativo)
- Sesgo $< 3\%$

C. Precisión

- Coeficiente de variación (CV): < 5% para unos límites de 90-120%
- Tolerancia: < 30%

D. Especificidad

- Presencia de halo: negativo.

E. Intervalo

- Cumple con los parámetros de linealidad, exactitud y precisión.

El análisis estadístico de los resultados de los parámetros estudiados, para los criterios de aceptación mencionados, se realizó utilizando el programa estadístico comercial Minitab versión 15,0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Linealidad

Dentro del rango establecido (90 – 120%) se estudiaron cinco niveles de concentraciones y se analizaron en dos placas por triplicado cada concentración ($K = 5$, n° de réplicas = 6), obteniéndose un total de 30 determinaciones para los estándares y 30 determinaciones para las muestras.

Con los resultados de las cinco concentraciones del estándar y de la muestra, se preparó la Tabla 8 relacionando las concentraciones “X” (variable independiente o predictiva) y los tamaños de los halos “Y” (variable dependiente).

Tabla 8. Tamaño de los halos de los cinco niveles de concentraciones.

Concentración UI/mL (X)	Logaritmo concentración (UI/mL) Log (X)	Tamaño de los halos (mm) Y (Ordenadas)	
		Estándar	Muestra
0,26	-0,59	22,31	22,11
0,26	-0,59	22,63	22,17
0,26	-0,59	22,16	22,40
0,26	-0,59	22,42	22,26
0,26	-0,59	22,14	22,63
0,26	-0,59	22,80	22,80
0,32	-0,49	23,28	23,13
0,32	-0,49	23,13	22,97
0,32	-0,49	23,40	23,04

Tabla 8. Tamaño de los halos de los cinco niveles de concentraciones (cont.)

Concentración UI/mL (X)	Logaritmo concentración (UI/mL) Log (X)	Tamaño de los halos (mm) (Y)	
		Estándar	Muestra
0,32	-0,49	23,44	23,32
0,32	-0,49	23,39	23,30
0,32	-0,49	23,15	23,77
0,40	-0,40	24,00	24,35
0,40	-0,40	24,12	24,35
0,40	-0,40	24,10	24,06
0,40	-0,40	24,07	24,06
0,40	-0,40	24,23	24,01
0,40	-0,40	24,39	23,91
0,50	-0,30	25,30	24,98
0,50	-0,30	25,48	25,12
0,50	-0,30	25,15	25,33
0,50	-0,30	24,96	25,26
0,50	-0,30	25,15	25,10
0,50	-0,30	25,36	25,07
0,62	-0,21	27,13	26,86
0,62	-0,21	26,01	26,80
0,62	-0,21	25,92	26,09
0,62	-0,21	26,43	26,11
0,62	-0,21	26,43	25,93

Tabla 8. Tamaño de los halos de los cinco niveles de concentraciones (cont.)

Concentración UI/mL (X)	Logaritmo concentración (UI/mL) Log (X)	Tamaño de los halos (mm) (Y)	
		Estándar	Muestra
0,62	-0,21	26,43	26,52

La relación entre ambas variables se expresó matemáticamente como una recta de regresión del tipo $Y = bx + a$, donde “b” es el valor de la pendiente y “a” el término independiente. La pendiente “b” se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito). El término independiente “a”, u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo (AEFI, 2001).

La recta de regresión para el estándar fue: $Y_1 = 28,4 + 10,3 \log. \text{concentración } (X_1)$ y para la muestra: $Y_2 = 28,3 + 10,3 \log. \text{concentración } (X_2)$ (Tabla 9). Estas rectas se obtuvieron por el método de ajuste de mínimos cuadrados y a las concentraciones se le realizó una transformación matemática previa (uso de logaritmos) obteniéndose rectas lineales en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 0,26 y 0,62UI/mL. Las pendientes “b” y los términos independientes “a” para ambas ecuaciones demuestran la alta sensibilidad del método y el mínimo sesgo que presenta. La regresión lineal aplicada tanto al estándar como a la muestra establece el diseño del modelo matemático, representado como una ecuación, que permite establecer o simular el comportamiento de la variable dependiente (tamaño del halo) con respecto a la variable independiente (concentración).

El coeficiente de correlación “ r ” es un índice estadístico que indica el grado de relación (asociación lineal) entre las variables cuantitativas: “ X ” (concentración) e “ Y ” (tamaño del halo). Este coeficiente oscila entre -1 y +1, si “ r ” es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada, un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables (AEFI, 2001).

Los coeficientes de correlación obtenidos para el estándar y para la muestra son cercanos a 1 (Tabla 9), demostrando una correlación positiva entre las variables. Este coeficiente indica que existe una dependencia total entre las dos variables denominada relación directa (a mayor concentración del principio activo, mayor será el tamaño del halo), es decir cuando una variable aumenta, la otra también lo hace en idéntica proporción (Reyes, 2007).

La información obtenida mediante el cálculo de “ r ” es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo el coeficiente de determinación “ r^2 ” el que aporta una mayor significación estadística, ya que expresa la proporción de la variación total de “ Y ” explicada por el modelo (AEFI, 2001).

En la linealidad de este método, los coeficientes de determinación para el estándar y la muestra son mayores a 0,95 (Tabla 9); cumpliendo con los criterios de aceptación para este parámetro e indicando un alto grado de relación entre las variables.

Tabla 9. Datos obtenidos del análisis de regresión de la recta estándar y de la recta muestra.

Rectas	Predictor	Coefficiente	Criterios de aceptación
Estándar	Constante	28,3879	—
	Log. Concentración (X)	10,2831	—
	Coefficiente de correlación (r)	98,4% (0,984)	$r \geq 0,98$
	Coefficiente de determinación (r^2)	96,8% (0,968)	$r^2 \geq 0,95$
Muestra	Constante	28,3416	—
	Log. Concentración (X)	10,2575	—
	Coefficiente de correlación (r)	98,1% (0,981)	$r \geq 0,98$
	Coefficiente de determinación (r^2)	96,2% (0,962)	$r^2 \geq 0,95$

En la evaluación estadística de la linealidad, la representación gráfica de la recta de regresión en el sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste del método (AEFI, 2001).

Las gráficas de línea ajustada para el estándar y la muestra (Figura 3 y 4 respectivamente) permiten visualizar la distribución de los datos experimentales, su cercanía a las rectas de regresión establecidas y su posición dentro de los intervalos de confianza y de predicción.

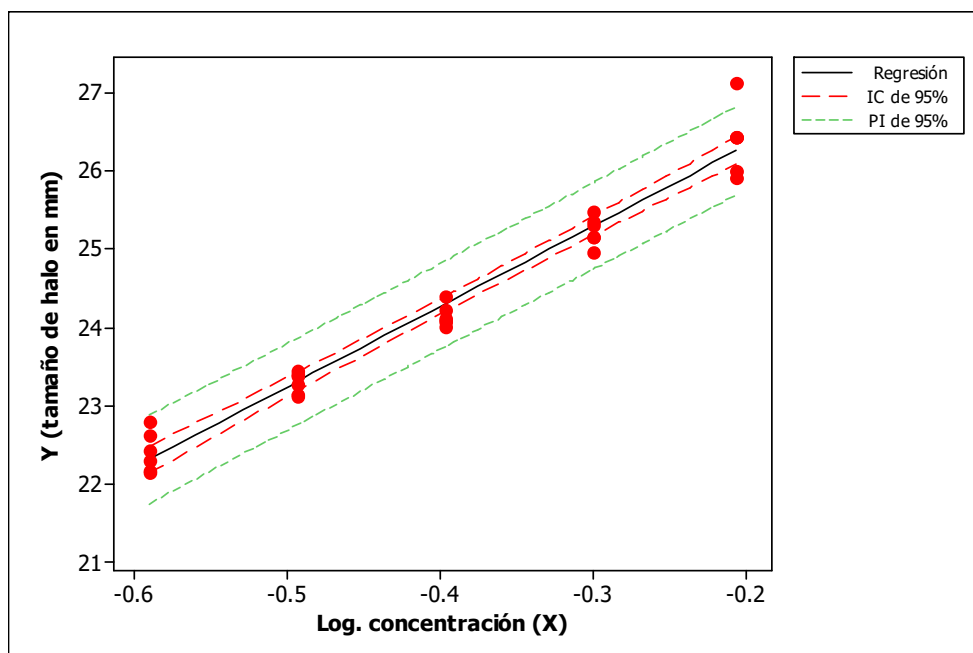


Figura 3. Gráfica de línea ajustada de la recta estándar.

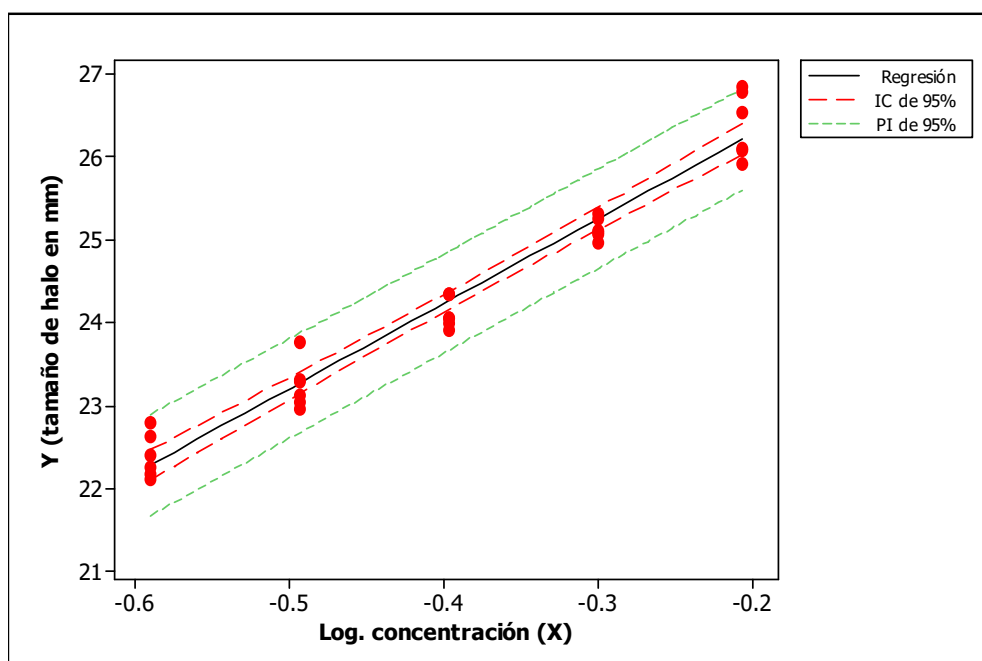


Figura 4. Gráfica de línea ajustada de la recta muestra.

En el análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó el test “F” de Snedecor y a partir de este test se calculó el nivel de significación (P). En este análisis se proporcionaron los valores de los grados de libertad (GL), la suma de cuadrados (SC) y el cuadrado de la media (MC) (Tablas 10 y 11).

En el ANOVA del estándar y de la muestra los valores del test “F” fueron: F_1 estándar = 844,55 (Tabla 10) y F_1 muestra = 715,00 (Tabla 11); los niveles de significación para ambos fue de 0,000 (Tablas 10 y 11); por lo que queda establecida una relación de dependencia significativa y una relación lineal entre ambas variables.

En este análisis, la variabilidad del error residual se descompuso en dos términos: la suma de cuadrados de la falta de ajuste y el error puro. Esta descomposición permitió realizar un segundo test “F” de Snedecor para la falta de ajuste, que indica si el modelo de regresión empleado es adecuado para los datos disponibles (AEFI, 2001).

En este segundo test los valores “F” y “P” para el estándar fueron $F_2 = 1,69$ y $P_2 = 0,195$ (Tabla 10) y para la muestra $F_2 = 2,10$ y $P_2 = 0,125$ (Tabla 11). Ambos valores son no significativos ($P > 0,05$) lo que confirma que la modelización de los datos es adecuada y se observa un ajuste de los valores al modelo de regresión lineal.

En la normalidad de la distribución de los residuales, tanto del estándar como de la muestra éstos se ajustaron a una ley normal y para comprobarlo se analizaron las gráficas de probabilidad normal de los residuales de ambos. Detectándose un evidente alineamiento de los residuales a las rectas (Figuras 5 y 6).

Tabla 10. Datos obtenidos del análisis de la varianza de la recta estándar.

Determinación	Fuentes	GL	SC	MC	F	P	Criterios de aceptación
Análisis de varianza – F ₁	Regresión	1	58,734	58,734	844,55	0,000	P < 0,05 (significativo)
	Error residual	28	1,947	0,070	—	—	—
Análisis de varianza – F ₂	Falta de ajuste	3	0,328	0,109	1,69	0,195	P > 0,05 (no significativo)
	Error puro	25	1,619	0,065	—	—	—
	Total	29	60,681	—	—	—	—

Tabla 11. Datos obtenidos del análisis de la varianza de la recta muestra.

Determinación	Fuentes	GL	SC	MC	F	P	Criterios de aceptación
Análisis de varianza – F ₁	Regresión	1	58,441	58,441	715,00	0,000	P < 0,05 (significativo)
	Error residual	28	2,289	0,082	—	—	—
Análisis de varianza – F ₂	Falta de ajuste	3	0,461	0,154	2,10	0,125	P > 0,05 (no significativo)
	Error puro	25	1,827	0,073	—	—	—
	Total	29	60,729	—	—	—	—

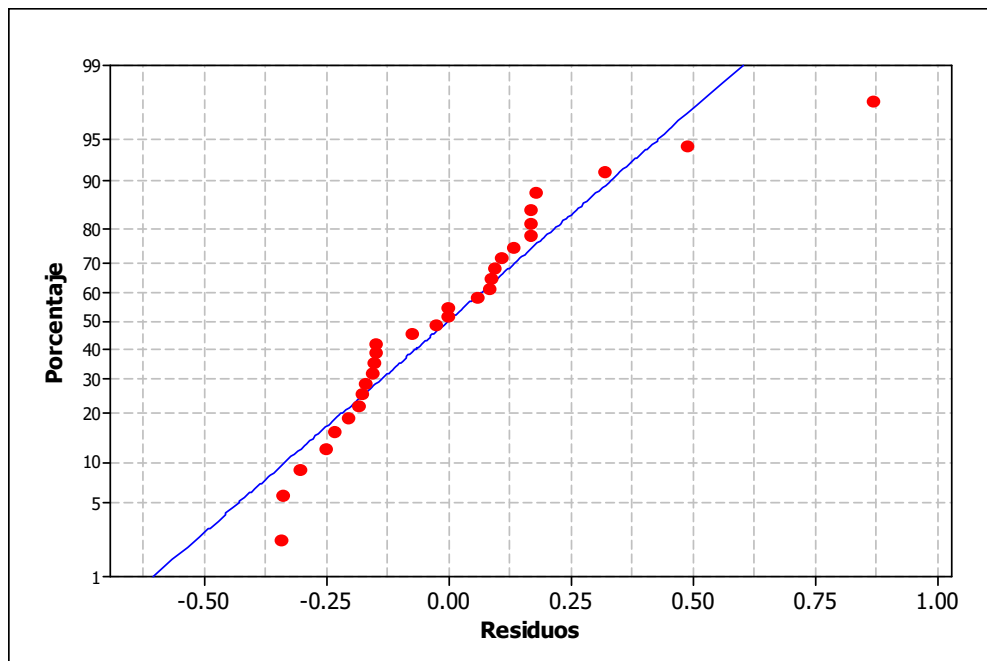


Figura 5. Gráfica de probabilidad normal de la recta estándar.

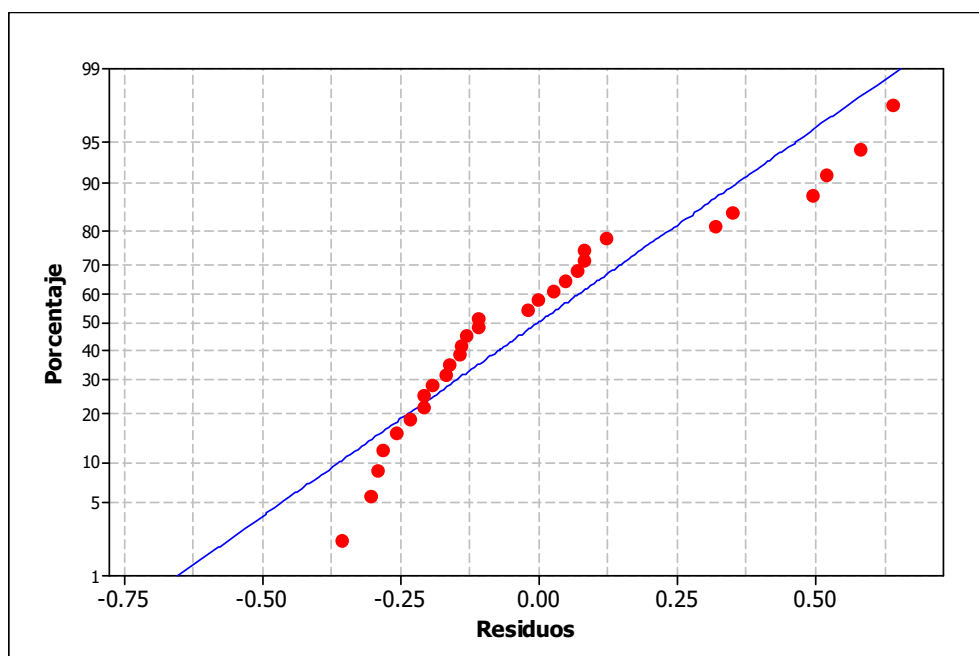


Figura 6. Gráfica de probabilidad normal de la recta muestra.

En la varianza residual constante (homocedasticidad) la representación de los residuales aportó mucha información acerca de la validez del modelo. La forma más habitual de representarla es enfrenar los residuales frente a los valores estimados, los valores estimados en las abscisas y sus correspondientes residuales en las ordenadas.

Los residuales representan la aleatoriedad en el desajuste predictivo del modelo y no tienen correlación alguna con los valores estimados (AEFI, 2001).

En las gráficas de residuales del estándar y de la muestra (Figura 7 y 8 respectivamente), estos no adoptan ningún patrón consistente, presentan una distribución de puntos aleatoria y no reflejan ninguna tendencia. Si existiera un patrón de distribución en los residuales, podría sugerir la necesidad de corregir el modelo (AEFI, 2001).

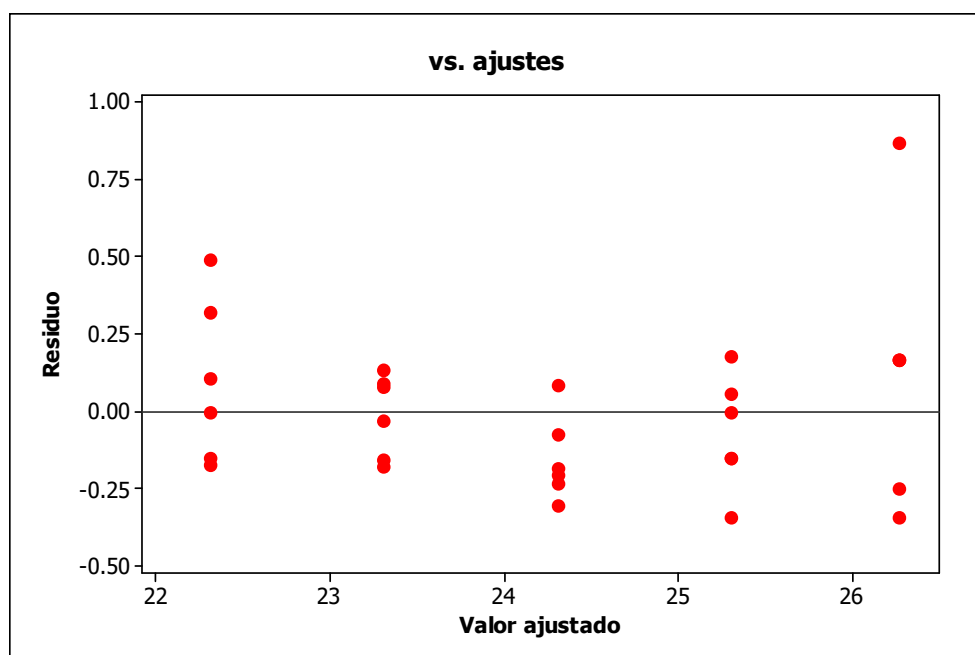


Figura 7. Gráfica de residuales de la recta estándar.

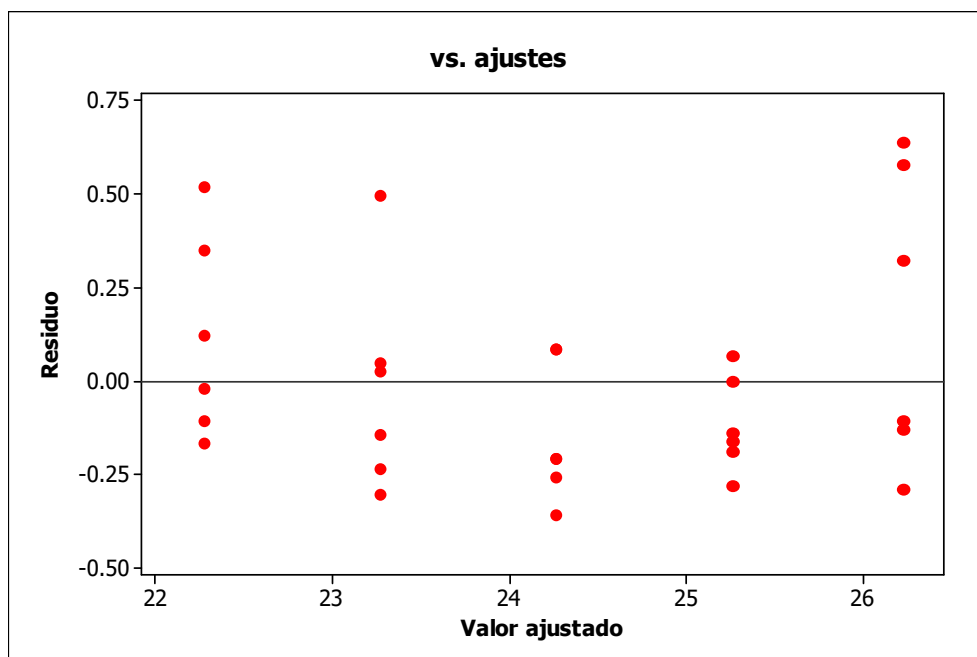


Figura 8. Gráfica de residuales de la recta muestra.

Para la comparación de las dos rectas de regresión (estándar y muestra) se formuló tres hipótesis: de paralelismo, de punto de corte y de coincidencia. Para comprobar estas hipótesis se definió una variable ficticia “Z” (0 = estándar y 1 = muestra) que representó a las dos rectas; y se estimó un único modelo de regresión múltiple que incluyó el término de interacción “XZ”. La ecuación de la recta de regresión múltiple fue de la forma: $Y = \alpha + \beta X + \gamma Z + \delta I + \epsilon$. Estas hipótesis afectan a los coeficientes de regresión y se verifican con las pruebas de “F” (AEFI, 2001).

Con los datos obtenidos en el análisis de regresión conjunta de ambas rectas de regresión (Tabla 12), la ecuación resultante fue $Y = 28,4 + 10,3 \log. \text{concentración (X)} - 0,046 Z - 0,026 XZ$. Las dos primeras hipótesis (paralelismo e igual punto de corte), se comprobaron directamente a partir de los niveles de significación de “Z” y “XZ”. El valor de significación de la variable “XZ” (0,961) demuestra que las rectas son paralelas y el valor de significación de la variable “Z” (0,834) indica que las rectas tienen igual punto de corte.

Para la hipótesis de coincidencia ($\gamma = \delta = 0$), se calculó el nivel de significación de “F”, para lo cual se hizo un análisis de regresión conjunta pero sin incluir a las variables “Z” y “XZ”; se calculó con la fórmula del cociente de “F” detallada en el anexo 2]. La hipótesis de coincidencia tuvo un valor de $P = 0,9273$ superior al 0,05 indicado en el criterio de aceptación para este parámetro. Se concluyó que las rectas son paralelas, tienen igual punto de corte y por lo tanto, son coincidentes (Figura 9).

Tabla 12. Datos obtenidos del análisis de regresión conjunta de dos rectas de regresión.

Predictor	Coefficiente	P	Criterios de aceptación
Constante	28,3879	0,000	—
Log. concentración (X)	10,2831	0,000	—
Z	-0,0462	0,834 (Test de punto de corte)	—
XZ	-0,0257	0,961 (Test de paralelismo)	—
Test de coincidencia	—	0,9273	$P > 0,05$ (no significativo)

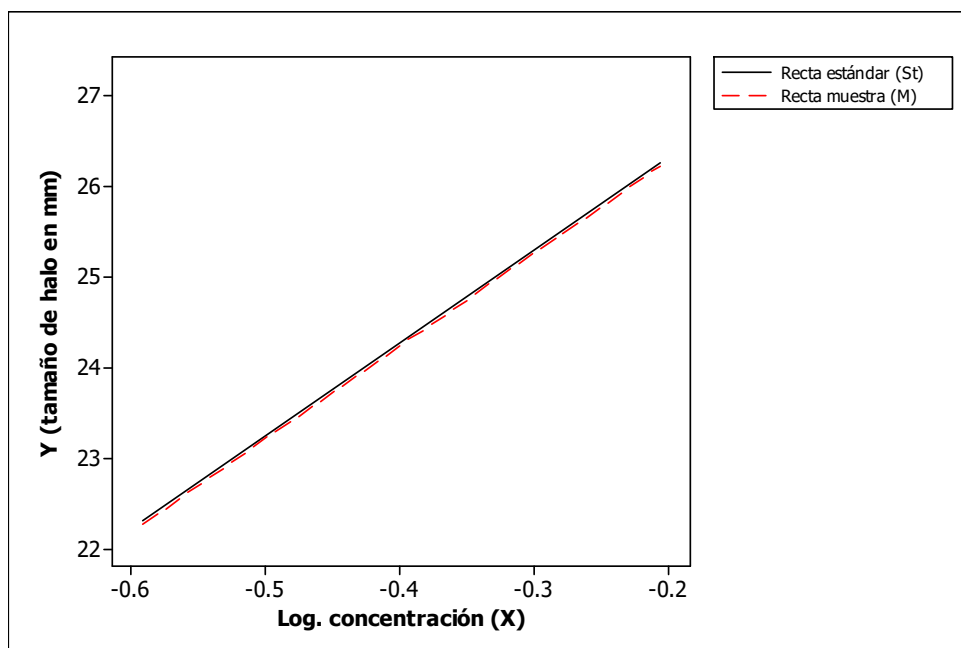


Figura 9. Gráfica de dispersión de la recta estándar y de la recta muestra.

5.2. Exactitud

La exactitud se demostró en todo el intervalo especificado para el método analítico (90 – 120%) y se evaluó con 9 determinaciones sobre 3 niveles diferentes (90, 100 y 120%) de concentraciones del estándar.

El problema del método del placebo cargado está en cómo se introduce el analito sobre el placebo. El proceso de adición, por mucho que se simule lo más exactamente posible a la preparación del producto terminado, sólo se trata de una aproximación ya que en el producto acabado real el analito o principio activo está íntimamente mezclado con los otros ingredientes. Por lo tanto, la eficacia de la recuperación obtenida con el método del placebo cargado puede llegar a ser más elevada de lo que en realidad es. Aún teniendo en cuenta este inconveniente, el método del placebo cargado es una técnica

común y aceptada para la determinación de la recuperación y la exactitud de un método (AEFI, 2001).

Con los datos obtenidos de las lecturas del tamaño de los halos del estándar y de las muestras (Tabla 13 y 14 respectivamente), se calculó el promedio y el coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación (100,42% y 10,21% respectivamente), el promedio de los sesgos (0,42%) de cada determinación y la varianza de cada nivel de concentración (90% = 1,61800; 100% = 1,53532 y 120% = 0,02908).

La varianza es una medida de dispersión que nos permitió conocer que tanto se dispersaron los datos alrededor de su promedio o media. El nivel de concentración que presentó menor dispersión alrededor de su promedio fue de 120% con una varianza de 0,02908.

Tabla 13. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos del estándar.

N° de Lectura	Tamaño de halo (mm)	Tamaño de halo (mm)	Tamaño de halo (mm)	Promedio	Concentracion del St3 Promedio
1	22,50	22,46	22,32	22,43	0,018
2	22,30	22,25	22,20	22,25	0,018
3	22,22	22,32	22,25	22,26	0,018
4	22,13	22,28	22,34	22,25	0,018
5	22,36	22,35	22,23	22,31	0,018
6	22,06	22,07	22,51	22,21	0,018
Promedio				22,2863	0,018
RSD (%)				0,341	0,339

Tabla 14. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras.

Muestra	Peso (UI)	Tamaño de halo (mm)	Media	UI hallado	Promedio	Porcentaje	Sesgo (%)	Varianza
90%	903,2	22,56	22,480	1014,19	1010,5960	111,8894	11,89	1,61800
		22,42		1007,90				
		22,54		1013,29				
		22,68		1019,59				
		22,61		1016,44				
		22,07		992,16				
	903,2	22,57	22,675	1014,64	1019,3623	112,8599	12,86	
		22,60		1015,99				
		22,80		1024,98				
		22,62		1016,89				
		22,73		1021,83				
		22,73		1021,83				
	903,2	22,32	22,168	1003,40	996,5849	110,3381	10,34	
		22,00		989,02				
		21,99		988,57				

Tabla 14. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras (cont.)

Muestra	Peso (UI)	Tamaño de halo (mm)	Media	UI hallado	Promedio	Porcentaje	Sesgo (%)	Varianza
90%	903,2	22,05	22,168	991,27	996,5849	100,3381	10,34	1,61800
		22,25		1000,26				
		22,40		1007,00				
100%	1001,9	22,49	22,3	1011,05	1004,1	100,22	0,22	1,35532
		22,24		999,81				
		22,39		1006,55				
		22,29		1022,05				
		22,36		1005,20				
	1001,9	22,24	22,9	999,81	1027,3	102,54	2,54	
		23,15		1040,72				
		23,16		1041,17				
		22,89		1029,03				
		22,31		1002,95				
		22,74		1022,28				
		22,86		1027,68				

Tabla 14. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras (cont.)

Muestra	Peso (UI)	Tamaño de halo (mm)	Media	UI hallado	Promedio	Porcentaje	Sesgo (%)	Varianza
100%	1001,9	22,55	22,6	1013,74	1017,6	101,57	1,57	1,35532
		22,59		1015,54				
		22,64		1017,79				
		22,67		1019,14				
		22,56		1014,19				
		22,80		1024,78				
120%	1206,8	23,48	23,6	1055,55	1061,7	87,98	-12,02	0,02908
		23,77		2068,59				
		23,99		1078,48				
		23,15		1040,72				
		23,09		1038,02				
		24,22		1088,82				
	1206,8	22,82	23,7	1025,88	1065,1	88,26	-11,74	
		23,88		1073,53				
		23,46		1054,65				

Tabla 14. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras (cont.)

Muestra	Peso (UI)	Tamaño de halo (mm)	Media	UI hallado	Promedio	Porcentaje	Sesgo (%)	Varianza
120%	1206,8	24,11	23,7	1083,87	1065,1	88,26	-11,74	0,02908
		24,28		1091,52				
		23,61		1061,40				
	1206,8	24,21	23,7	1088,37	1065,4	88,28	-11,72	
		24,01		1079,38				
		23,95		1076,68				
		23,14		1040,27				
		23,19		1042,51				
		23,69		1064,99				
	Promedio					100,42	0,42	
Coeficiente de variación (CV)					10,21			

La recuperación fue satisfactoria (media = 100,42%) a pesar que no siempre se obtienen valores de recuperación cercanos al 100%. Esta recuperación generalmente depende de la matriz de la muestra, de la efectividad del método de preparación y extracción y de la concentración del analito. (AEFI, 2001).

Para determinar la influencia de la concentración del analito en los resultados se utilizó el test de Cochran o test de igualdad de varianzas (homogeneidad de varianzas), por ser una prueba muy sensible que se utiliza cuando se tiene varios grupos muestrales del mismo tamaño (AEFI, 2001).

Se obtuvo un valor $G_{exp} = 0,539$. Al ser $G_{exp} < G_{tablas}$ ($0,539 < 0,8709$) se demuestra que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir, las varianzas son homogéneas y el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Para confirmarlo se aplicó un test de student, obteniéndose un valor $t_{exp} = 0,1293$. Al ser $t_{exp} < t_{tablas}$ ($0,1293 < 2,306$), se comprobó que no existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100% (anexo 3).

El valor promedio de los sesgos de cada determinación fue de 0,42%, menor al criterio de aceptación (3%) lo que nos indicó que el error sistemático es mínimo y no interfiere en las mediciones realizadas (Tabla 15). Este sesgo pudo ser originado por un error en los equipos, instrumentos, por una particularidad del analista o del proceso de medición, entre otros (Hoyos, 2010).

Tabla 15. Datos obtenidos en la evaluación del parámetro exactitud en el proceso de validación de bacitracina.

Determinación		Resultados	Criterios de aceptación
Homogeneidad de varianzas	P	Valor $G_{\text{exp}} = 0,5015$	$P > 0,05$ (no significativo)
Sesgo	e%	2,75%	Inferior al 3%
T de student	P	Valor $t_{\text{exp}} = 3,0956$	$P > 0,05$ (no significativo)

5.3. Precisión

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo, debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles a influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de este parámetro (AEFI, 2001).

5.3.1. Repetibilidad

La repetibilidad del método depende generalmente del proceso de preparación de la muestra. Es decir, cuanto mayor sea la manipulación de la muestra más probable es que la variabilidad del método aumente. Otro de los factores que más puede influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito.

Así, por ejemplo, cuando se trabaja a concentraciones altas (materia prima) se aceptan valores de coeficiente de variación más bajos que cuando se trabaja a concentraciones más bajas (por ejemplo impurezas). Por otro lado, el valor aceptado del coeficiente de variación depende del intervalo de aceptación (especificaciones) especificado en el método de análisis (AEFI, 2001).

La repetibilidad del método, se efectuó sobre una serie de muestras que fueron analizadas independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) con los mismos instrumentos y el mismo analista.

Se realizaron las lecturas del tamaño de los halos del estándar y de las muestras, obteniéndose con estos datos el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) y la tolerancia de una serie de medidas (Tablas 16 y 17).

Tabla 16. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos del estándar.

N° de Lectura	Tamaño de halo (mm)	Tamaño de halo (mm)	Tamaño de halo (mm)	Promedio	Concentracion del St3 Promedio
1	23,67	23,72	23,76	23,717	0,017
2	24,14	24,37	23,70	24,070	0,017
3	23,97	23,26	23,64	23,623	0,017
4	24,12	23,92	23,75	23,930	0,017
5	23,62	23,93	23,80	23,783	0,017
6	24,06	23,31	23,73	23,700	0,017
Promedio				23,804	0,017
RSD (%)				0,698	0,696

Tabla 17. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras.

Muestra	Peso (g)	Tamaño de halo (mm)	Promedio	UI/100g	Promedio	Porcentaje
1	2,0067	23,47	23,85	49228,43	50032,4761	100,06
		24,31		50990,34		
		23,36		48997,71		
		24,17		50696,69		
		23,44		49165,51		
		24,37		51116,19		
2	2,0018	23,40	23,88	49081,61	50077,9220	100,16
		23,67		49647,93		
		24,33		51032,29		
		23,93		50193,28		
		23,77		49857,68		
		24,15		50654,74		
3	2,0096	23,93	24,01	50193,28	50368,0768	100,74
		24,09		50528,89		
		24,25		50864,49		
		24,32		51011,31		
		23,70		49710,86		
		23,79		49899,63		

Tabla 17. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras.

Muestra	Peso (g)	Tamaño de halo (mm)	Promedio	UI/100g	Promedio	Porcentaje
4	2,0029	23,74	24,09	49794,76	50525,3897	101,05
		24,40		51179,11		
		23,99		50319,14		
		23,91		50151,33		
		24,08		50507,91		
		24,41		51200,09		
5	2,0086	23,96	24,11	50256,21	50577,8273	101,16
		24,31		50990,34		
		23,91		50151,33		
		23,37		49018,68		
		24,36		51095,21		
		24,77		51955,19		
6	2,0081	23,79	23,91	49899,63	50154,8305	100,31
		24,10		50549,86		
		23,66		49626,96		
		23,50		49291,36		
		24,00		50340,11		
		24,42		51221,06		

Tabla 17. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras.

Muestra	Peso (g)	Tamaño de halo (mm)	Promedio	UI/100g	Promedio	Porcentaje
7	2,0022	23,51	23,99	49312,33	50322,6309	100,65
		24,09		50528,89		
		24,09		50528,89		
		24,05		50444,99		
		24,22		50801,56		
		23,99		50319,14		
8	2,0070	24,17	24,21	50696,69	50780,5860	101,56
		24,15		50654,74		
		24,54		51472,76		
		24,16		50675,71		
		23,72		49752,81		
		24,52		51430,81		
9	2,0075	24,01	23,95	50361,09	50235,2349	100,47
		24,16		50675,71		
		23,80		49920,61		
		23,89		50109,38		
		24,03		50403,04		
		23,81		49941,58		
				Promedio	100,683	
				Desviación estándar	0,498	

El coeficiente de variación (CV) nos indica la relación existente entre la desviación de una muestra y su media; y tiene una relación directamente proporcional con la dispersión de las muestras, a menor dispersión, menor será el coeficiente de variación. La tolerancia expresa la variabilidad del método respecto al intervalo entre las especificaciones superior e inferior (AEFI, 2001).

Se realizó un test de normalidad Kolmogorov, para probar que las muestras provenían de una distribución continua (normal). Este test está basado en la comparación de las diferencias entre la distribución acumulada de los valores de la muestra (p) y la distribución acumulada que se obtendría en el supuesto que se siguiera exactamente una ley normal. En este test se debe usar gráficos y cualquier comprobación estadística para evaluar el grado real de la desviación de la normalidad (AEFI, 2001).

Esta prueba de bondad de ajuste se basó en la comparación entre la probabilidad normal acumulada de las muestras (p) y los valores obtenidos de la división del orden de las muestras y el número total de éstas (i). En esta prueba se calculó la desviación máxima ($D^* = 0,118717$) de las diferencias absolutas (D) entre " p " e " i ". A este valor de desviación máxima le corresponde: $D^* = 0,387$ para un nivel de significación $\alpha = 0,10$; $D^* = 0,430$ para $\alpha = 0,05$ y $D^* = 0,513$ para $\alpha = 0,01$. Se acepta la hipótesis de normalidad de la distribución porque el nivel de significación del valor $D^* = 0,118717$ para una muestra de 9 elementos es superior a 0,10 (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis estadístico: test de normalidad (Kolmogorov):

Resultado (%) (X)	Resultados ordenados (X)	Resultado estandarizado $Z = \frac{(X - \bar{X})}{s}$	Probabilidad normal acumulada (p)	Orden (r)	$\frac{r}{i} = \frac{r}{n}$	Diferencia D= p - i
100,06	100,06	-1,25460	0,106570	1	0,11111	0,004542
100,16	100,16	-1,05369	0,148202	2	0,22222	0,074020
100,74	100,31	-0,75232	0,228749	3	0,33333	0,104584
101,05	100,47	-0,43085	0,336627	4	0,44444	0,107818
101,16	100,65	-0,06920	0,475982	5	0,55556	0,079574
100,31	100,74	0,11162	0,547949	6	0,66667	0,118717 D*
100,65	101,05	0,73446	0,771251	7	0,77778	0,006527
101,56	101,16	0,95546	0,832441	8	0,88889	0,056448
100,47	101,56	1,75912	0,961392	9	1,00000	0,038608

La desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de la repetibilidad del método tuvo un valor de 0,49%, encontrándose dentro del criterio de aceptación establecido e indicando una menor dispersión de las muestras. En la variabilidad de los resultados de este método, los análisis se efectuaron con seis réplicas, obteniéndose un valor de variabilidad de 0,2033%. Esto significa que la tolerancia del método para una variabilidad de 0,2033% en un intervalo entre 90 y 120% es de 4,066% (Tabla 19).

Tabla 19. Datos obtenidos en la evaluación del parámetro precisión (repetibilidad) en el proceso de validación de bacitracina.

Determinación	Resultados	Criterios de aceptación
Coefficiente de variación	0,49%	< 5%
Tolerancia	4,066%	< 30%

5.3.2. Precisión intermedia

El objetivo del estudio de la precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes. En el estudio de la precisión intermedia se consideraron aquellas circunstancias en las que se desarrolló el método de ensayo (AEFI, 2001).

Se evaluaron los efectos causados al variar una serie de factores típicos (día, analista, etc.). No es necesario evaluar cada uno de estos factores individualmente sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores esta dentro de los límites establecidos (AEFI, 2001).

El coeficiente de variación (CV) nos indica la relación existente entre la desviación de una muestra y su media; y tiene una relación directamente proporcional con la dispersión de las muestras, a menor dispersión, menor será el coeficiente de variación. La tolerancia expresa la variabilidad del método respecto al intervalo entre las especificaciones superior e inferior (AEFI, 2001).

Generalmente se aceptan valores de coeficiente de variación de la precisión intermedia inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método. En caso de que no se cumpla es necesario evaluar cual es el factor responsable de esta variabilidad (AEFI, 2001).

Se realizaron las lecturas del tamaño de los halos del estándar y de las muestras, obteniéndose con estos datos el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) y la tolerancia de una serie de medidas (Tablas 20 y 21).

Tabla 20. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos del estándar.

N° de Lectura	Tamaño de halo (mm)	Tamaño de halo (mm)	Tamaño de halo (mm)	Promedio	Concentracion del St3 Promedio
1	23,07	23,85	23,08	23,333	0,017
2	23,39	23,14	23,23	23,253	0,017
3	23,49	23,59	23,26	23,447	0,017
4	23,82	23,33	23,20	23,450	0,017
5	23,62	23,81	23,00	23,477	0,017
6	23,94	23,27	23,04	23,417	0,017
Promedio				23,396	0,017
RSD (%)				0,366	0,367

Tabla 21. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras.

Muestra	Peso (g)	Tamaño de halo (mm)	Promedio	UI/100g	Promedio	Porcentaje
1	2,0089	24,03	23,72	51223,87	50552,3918	101,10
		24,03		51223,87		
		22,95		48921,67		
		23,11		49262,74		
		24,14		51458,35		
		24,03		51223,87		
2	2,0053	23,99	23,61	51138,60	50321,4616	100,64
		23,49		50072,77		
		23,38		49838,28		
		23,55		50200,67		
		23,41		49902,23		
		23,82		50776,22		
3	2,0094	23,90	24,04	50946,75	51245,1823	102,49
		23,96		51074,65		
		24,05		51226,50		
		23,60		50307,25		
		24,19		51564,93		
		24,54		52311,01		

Tabla 21. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras (cont.)

Muestra	Peso (g)	Tamaño de halo (mm)	Promedio	UI/100g	Promedio	Porcentaje
4	2,0042	24,05	23,77	51266,50	50669,6333	101,34
		23,86		50861,48		
		23,86		50861,48		
		23,58		50264,62		
		23,22		49497,22		
		24,05		51266,50		
5	2,0005	23,56	23,84	50221,98	50825,9552	101,65
		23,94		51032,02		
		24,11		51394,40		
		24,10		51373,08		
		24,02		51202,55		
		23,33		49731,70		
6	2,0050	24,25	23,88	51692,83	50911,2218	101,82
		24,44		52097,85		
		23,70		50520,42		
		23,58		50264,62		
		23,82		50776,22		
		23,51		50115,40		

Tabla 21. Datos obtenidos del análisis del tamaño de los halos de las muestras (cont.)

Muestra	Peso (g)	Tamaño de halo (mm)	Promedio	UI/100g	Promedio	Porcentaje
7	2,0033	23,16	23,30	49369,32	49451,0325	98,90
		23,16		49369,32		
		23,03		49092,20		
		23,41		49902,23		
		23,17		49390,64		
		23,26		49582,49		
8	2,0075	23,66	23,88	50435,15	50897,0107	101,79
		24,22		5162,88		
		23,90		50946,75		
		23,87		50882,80		
		23,52		50136,72		
		24,09		51351,77		
9	2,0067	23,95	23,61	51053,33	50317,9088	100,64
		23,28		49625,12		
		23,56		50221,98		
		23,74		50605,68		
		23,37		49816,97		
		23,73		50584,37		
				Promedio	101,154	

Se realizó un test de normalidad Kolmogorov, para probar que las muestras provenían de una distribución continua (normal). Este test está basado en la comparación de las diferencias entre la distribución acumulada de los valores de la muestra (p) y la distribución acumulada que se obtendría en el supuesto que se siguiera exactamente una ley normal. En este test se debe usar gráficos y cualquier comprobación estadística para evaluar el grado real de la desviación de la normalidad (AEFI, 2001).

Esta prueba de bondad de ajuste se basó en la comparación entre la probabilidad normal acumulada de las muestras (p) y los valores obtenidos de la división del orden de las muestras y el número total de estas (i). En esta prueba se calculó la desviación máxima ($D^* = 0,118717$) de las diferencias absolutas (D) entre " p " e " i ". A este valor de desviación máxima le corresponde: $D^* = 0,387$ para un nivel de significación de $\alpha = 0,10$; $D^* = 0,430$ para $\alpha = 0,05$ y $D^* = 0,513$ para $\alpha = 0,01$. Se acepta la hipótesis de normalidad de la distribución porque el nivel de significación del valor $D^* = 0,146578$ para una muestra de 9 elementos es superior a 0,10 (Tabla 22).

La desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de la precisión intermedia del método tuvo un valor de 1,02%, encontrándose dentro del criterio de aceptación establecido e indicando una menor dispersión de las muestras. En la variabilidad de los resultados de este método, los análisis se efectuaron con seis réplicas, obteniéndose un valor de variabilidad de 0,42%. Esto significa que la tolerancia del método para una variabilidad de 0,42% en un intervalo entre 90 y 120% es de 8,4% (Tabla 23).

Se observa que a pesar que los resultados de la precisión intermedia poseen valores correspondientes al doble del coeficiente de variación y tolerancia de la repetibilidad del método, se encuentran dentro de los criterios de aceptación especificados.

Tabla 22. Análisis estadístico: test de normalidad (Kolmogorov).

Resultado (%) (X)	Resultados ordenados (X)	Resultado estandarizado $Z = \frac{(X - \bar{X})}{s}$	Probabilidad normal acumulada (p)	Orden (r)	$\frac{r}{n}$	Diferencia D= p - i
101,10	98,90	-2,18172	0,014464	1	0,11111	0,096647
100,64	100,64	-0,49619	0,310249	2	0,22222	0,088026
102,49	100,64	-0,49619	0,310249	3	0,33333	0,023085
101,34	101,10	-0,05059	0,480641	4	0,44444	0,036197
101,65	101,34	0,18190	0,573176	5	0,55556	0,017621
101,82	101,65	0,48220	0,686317	6	0,66667	0,019650
98,90	101,79	0,61781	0,732818	7	0,77778	0,044959
101,79	101,82	0,64688	0,742311	8	0,88889	0,146578 D*
100,64	102,49	1,29590	0,903366	9	1,00000	0,096634

Tabla 23. Datos obtenidos en la evaluación del parámetro precisión (precisión intermedia) en el proceso de validación de bacitracina.

Determinación	Resultados	Criterios de aceptación
Coeficiente de variación	1,03%	< 5%
Tolerancia	8,4%	< 30%

5.4. Especificidad

El estudio de la especificidad, es uno de los parámetros de mayor importancia dentro de la validación de un método analítico, da a conocer en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con él de una u otra forma (AEFI, 2001).

Se demostró que el método analítico no presenta interferencia alguna por la presencia de otros antibióticos y excipientes presentes en el producto terminado (placebo) o por solventes y diluyentes utilizados en su extracción (Tabla 24).

En el análisis del placebo, solvente y diluyente no se observó formación de halos, demostrando que no intervienen en la formación de los halos al valorar al antibiótico bacitracina (Tabla 24).

Se realizó el análisis del estándar de referencia secundario de bacitracina (concentración = 0,4UI/mL) en el cual sí se observó la formación de halos de inhibición (promedio = 16,20) (Tabla 24).

Tabla 24. Datos obtenidos en la evaluación del parámetro especificidad en el proceso de validación de bacitracina.

Muestra	Tamaño de halo (mm)	Porcentaje interferencia	Observación
Placebo	0,00	0,00	Conforme
Buffer N°6 (pH = 6,0)	0,00	0,00	Conforme
Estándar	16,20	-	Conforme

5.5. Intervalo

Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuales son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, se tomó como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido (90-120%) de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en función de la especificaciones (AEFI, 2001).

Según lo detallado anteriormente los parámetros de linealidad, exactitud y precisión cumplen con sus criterios de aceptación respectivos, condiciones suficientes para determinar la conformidad del parámetro de intervalo.

Tabla 25. Datos obtenidos en la evaluación del parámetro intervalo en el proceso de validación de bacitracina.

Elementos		Intervalo	Resultado
Exactitud		90% - 120%	Cumple
Precisión	Repetibilidad	100%	Cumple
	P. intermedia	100%	
Linealidad		0,26UI/mL – 0,62UI/mL	Cumple

5.6. Ventajas respecto al método normalizado

La USP vigente (USP 34, 2011) ofrece un método analítico microbiológico para la valoración del antibiótico bacitracina que no se ajusta a la realidad de todos los laboratorios de análisis (no siempre se logra crecimiento de *Micrococcus luteus* ATCC

10240 en el medio antibiótico N°1) por lo que se hace imprescindible la aplicación de un método alternativo con su respectiva validación.

Este trabajo presenta el desarrollo y validación de un método alternativo factible, fiable y reproducible, que genera un impacto económico mínimo y se ajusta a la realidad de las empresas (acceso a equipos e insumos) además de conllevar beneficios adicionales (obtención rápida de los resultados) que justifican la inversión y el gasto adicional de las pruebas. Sigue los parámetros determinados por la USP vigente y añade criterios de aceptación apoyados por la Asociación Española de farmacéuticos de la Industria (AEFI, 2001).

La validación de este método permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo.

6. **CONCLUSIONES**

- La linealidad del método en el intervalo de concentraciones estudiadas, produce resultados proporcionales a la concentración del analito.
- La exactitud del método permite tener una recuperación media satisfactoria, asegurando la recuperación de la totalidad del analito presente en la muestra.
- El método es preciso al ser efectuado en el mismo laboratorio en días y con analistas diferentes. El grado de concordancia que existe entre las pruebas, nos permite obtener resultados repetitivos y reproducibles.
- El método tiene la capacidad de diferenciar precisa y específicamente al antibiótico bacitracina, en presencia de los demás principios activos y excipientes del producto terminado (placebo) que se espera que estén presentes en la matriz de la muestra, así como de los solventes y diluyentes utilizados en su extracción.
- El método analítico microbiológico para la valoración de bacitracina 50 000UI/100g, presenta resultados de linealidad, exactitud, precisión, especificidad e intervalo satisfactorios que permiten obtener resultados seguros, confiables en la detección y cuantificación de bacitracina

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALANIS, J. “*Revisión bibliográfica sobre los antibióticos macrólidos y su interés en medicina veterinaria*”. Asesor: Fernando Pintor. Tesis título profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México, 2007.
- ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA (A.E.F.I.). *Validación de métodos analíticos*. España, 2001. 331p.
- BETES, M.; DURAN, M.; MESTRES, C.; NOGUES. *Farmacología para Fisioterapeutas*. España: Medica Panamericana, 2008. ISBN 978-84-9835-174-3.
- BRITISH PHARMACOPOEIA (B.P.). *Biological assay of antibiotics*. Volume IV. Appendix XIV A. London, 2010.
- COLIZZA, S.; ROSSI, S.; RODIO, F.; CARNUCCIO, P.; CUCCHIARA, G. Treatment of gram-positive surgical sepsis: role of the oxazolidinones. *J Chemoter*. 2003, 14(4), p. 323-328.
- COMISIÓN EUROPEA. *Normas de correcta fabricación de medicamentos de uso humano y veterinario*. Madrid, 1999.
- DE AHUMADA, I.; SANTANA, L.; SERRANO, J. *Farmacología practica para las diplomaturas en ciencias de la salud*. España: Díaz de Santos, 2002. 536p. ISBN. 84-7978-533-0.
- DE CARLOS, F. *Manual del técnico superior en higiene buco dental*. 1ra edición. España: Mad, 2005. 540p. ISBN. 84-665-3939-5.
- DIRECCIÓN GENERAL DE MEDICAMENTOS, INSUMOS Y DROGAS. *Manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos*. Perú. 1999.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA (E.P.). *Biological test*. 3rd edition. Supplement 2001.

- FARMAINDUSTRIA. *La aportación de los antibióticos a la salud*. España: 2004.
- GARG, A.; SHEPPARD, J.; DONNEFELD, E.; FRIEDLAENDER, M. *Tratamiento antibiótico y antiinflamatorio en oftalmología*. 1ª edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2010. 616p. ISBN 978-950-06-1712-3.
- GENNARO, A. *Remington farmacia*. 20ª edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2003. 1368p. ISBN 950-06-1967-2.
- GRANADOS, R. y VILLAVERDE, C. *Microbiología*. 1ª edición. España: International Parainfo, S.A., 2003. 352p. ISBN 84-9732-123-5.
- GURGUÍ, M. Nuevas quinolonas. *Med Clin*. 2003, 120(12), p. 458-459.
- GUTIÉRREZ, C. y NÚÑEZ, C. “Validación del método analítico microbiológico: valoración de gentamicina 0’1% en un producto terminado”. Asesor: Iván Torres. Tesis título profesional. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. Cajamarca, 2011.
- HOYOS, M. *Validación de métodos*. Universidad Nacional de Colombia: 2010, p. 1.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (I.C.H.). *Validation of analytical procedures*. 1995.
- INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA Y DE LA PROTECCIÓN DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL (I.N.D.E.C.O.P.I.). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. NTP-ISO/IEC 17025. Perú, 2006.
- JOHNSON, B.; ANKER, H.; MELENET, F. Bacitracin. A new antibiotic produced by a member of the subtilis group. *Science*. 1945. 102: 376 – 77.
- JURADO, A.; GARCÍA, M.; REYES, F.; MUÑOZ, J. Manejo clínico en el diagnóstico del paciente infectado. *Medicine*. 2002, 8(61), p. 3241-3254.

- LEYVA, A.; MORALES, I.; PACHCO, J.; DEMIRANDA, J.; ESQUIVEL, M. y ALVARADO, A. *Guía para la realización de estudios de estabilidad de medicamentos*. Costa Rica, 2001.
- LIO, P. Y KAYE, E. Topical antibacterial agents. *Infect Dis Clin N Am*. 2004. 18: 717 – 33.
- MENDOZA, N. *Farmacología médica*. México: Médica Panamericana, 2008. 1008p. ISBN. 978-968-7988-44-3.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (O.M.S.). *Informe 32*. Ginebra, 1992.
- PÉREZ, S. *Valoración microbiológica de los antibióticos*. 1ra edición. UNMSM, 1963. 213p.
- Perú. Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios 29459. *El Peruano*, 17 de Setiembre del 2010. p. 425912.
- Perú. Ley General de Salud 26842. *El Peruano*, 17 de Enero del 2009. p. 388834
- Perú. Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos médicos y Productos Sanitarios. *El Peruano*, 27 de julio del 2011. p. 447494.
- Perú. Disposiciones para el control de la calidad y el suministro de información sobre medicamentos. 2001.
- POOLE, V. Y PETERSON, A. *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice*. 2da edición. Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. ISBN 978-0-7817-5784-3.
- REYES, P. Regresión y correlación lineal. *Métodos estadísticos multivariados*. 2007.
- SÁENZ, E. Y SALDAÑA, L. Antibióticos tópicos. *Dermatología peruana*. 2005, vol. 5, n° 3, p 8 – 11.

- SANCHEZ, J. *Las enfermedades infecciosas en la historia humana*. 1ra edición. Libros en Red, 2011. ISBN 978-1-59754-645-4.
- Sciencenet Multimedia Publishing. *Bacteriology: Micrococcus luteus* [en línea]. Australia: Microbionet, 2003 [ref. de 10 de Marzo del 2008]. Disponible en: <<http://microbionet.com.au/mluteus.htm>>
- SUÁREZ, C.; GIL-CARCEDO, L.; MARCO, J.; MEDINA, J.; ORTEGA, P.; TRINIDAD, J. *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. 2da edición. España: Medica Panamericana, 2007. ISBN 978-84-9835-075-3.
- THORNTON, C.; TUTRONE, W.; WEINBERG, J. *et al.* Topical antibacterial agents for wound care: a primer. *Dermatol Surg.* 2003a. 29: 620 – 26.
- THORNTON, C.; TAYLOR, S.; WEINBERG, J. Topical antibacterial agents for in dermatology. *Clin in Dermatol.* 2003b. 21: 70 – 7.
- TORRES, L. *Anestesia y reanimación*. España: Aran, 2001. 3019p. ISBN 84-86725-82-8.
- TORRES, L. *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. España: Aran, 2002. 1683p. ISBN 84-95913-04-6.
- TRIPATHI, K. *Farmacología en odontología: fundamentos*. 1ª edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008. 528p. ISBN 978-950-06-0086-6.
- UNITED STATES PHARMACOPOEIA AND NATIONAL FORMULARY (U.S.P. 34). *Biological tests and assays* .2011.
- VELASQUEZ, B; LORENZO, P; MORENO, A; LIZASOAIN, I; LEZA, J; MORO, M; PORTOLES, A. *Farmacología básica y clínica*. 18ª edición. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2008. 1369p. ISBN 978-84-9835-168-2.
- VOET, D. Y VOET, J. *Bioquímica*. 3ra edición. Buenos Aires: Medica panamericana, 2006. 1776p. ISBN 950-06-2301-3.

- WHITMAN, W.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H.; TRUJILLO, M.; LUDWIG, W.; SUZUKI, K.; PARTE, A. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2da edición. Estados Unidos: Springer, 2012. 1034 p. ISBN 978-0-387-95043-3.

8. ANEXOS

Anexo 1. Medios de Cultivo

A. Caldo CASO

Ingredientes	Cantidad (g/L)
Peptona de Soja	3,0
D (+)- Glucosa	2,5
Peptona de caseína	17,0
Di-Potasio Hidrogeno Fosfato	2,5
Sodio Cloruro	5,0
Agua	1000mL

pH después de la esterilización: $7,3 \pm 0,2$.

B. Medio 11

Ingredientes	Cantidad (g/L)
Peptona	6,0
Digerido pancreático de caseína	4,0
Extracto de levadura	3,0
Extracto de carne	1,5
Dextrosa	1,0
Agar	15,0
Agua	1000mL

pH después de la esterilización: $6,5 \pm 0,1$.

Anexo 2. Linealidad

A. Estándar (St)

- Estándar de referencia secundario bacitracina:

$$\text{Potencia} = \frac{75,9 \text{ UI}}{\text{mg}}$$

- Cálculo del peso del estándar de referencia secundario bacitracina:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Concentración deseada (UI)} \times 1 \text{ mg}}{\text{Potencia del estándar cada 1 mg (UI)}}$$

$$\text{Peso (mg)} = \frac{1000 \text{ UI} \times 1 \text{ mg}}{75,9 \text{ UI}}$$

$$\text{Peso} = 13,18 \text{ mg}$$

- Dilución del estándar en fiola de 100mL:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potencia} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}} \right)}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{1001,88 \text{ UI}}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{10,0188 \text{ UI}}{\text{mL}}$$

- Dilución de los estándares en fioles de 50mL y sus concentraciones finales:

(razón = 1,25)

$$\text{St1} = \frac{10,0188 \text{ UI}}{\text{mL}} \times \frac{1,3 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = \frac{0,26 \text{ UI}}{\text{mL}}$$

$$\text{St2} = \frac{10,0188 \text{ UI}}{\text{mL}} \times \frac{1,6 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = \frac{0,32 \text{ UI}}{\text{mL}}$$

$$\text{St3} = \frac{10,0188 \text{ UI}}{\text{mL}} \times \frac{2 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = \frac{0,40 \text{ UI}}{\text{mL}}$$

$$\text{St4} = \frac{10,0188 \text{ UI}}{\text{mL}} \times \frac{2,5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = \frac{0,50 \text{ UI}}{\text{mL}}$$

$$St5 = \frac{10,0188UI}{mL} \times \frac{3,1mL}{50mL} = \frac{0,62UI}{mL}$$

B. Muestra (M)

- Cálculo del peso de la muestra:

$$\text{Peso (g)} = \frac{\text{Concentración deseada (UI)} \times 100g}{\text{Potencia del m uestra cada 100 g (UI)}}$$

$$\text{Peso (g)} = \frac{1000UI \times 100g}{50000UI}$$

$$\text{Peso} = 2g \text{ (peso teórico)}$$

- Cálculo de la potencia de la muestra:

$$\text{Potencia (UI)} = \frac{\text{Peso de la muestra (g)} \times \text{Potencia de la muestra cada 100g (UI)}}{100g}$$

$$\text{Potencia (UI)} = \frac{2,0 g \times 50000 UI}{100g}$$

$$\text{Potencia} = 1000,0 UI$$

- Extracción de la muestra en fiola de 100mL:

$$\text{Concentración} = \frac{1000,0UI}{100mL} = \frac{10,0UI}{mL}$$

- Concentraciones de las cinco muestras: (razón = 1,25)

$$M1 = \frac{10,0UI}{mL} \times \frac{1,3mL}{50mL} = \frac{0,26UI}{mL}$$

$$M2 = \frac{10,0UI}{mL} \times \frac{1,6mL}{50mL} = \frac{0,32UI}{mL}$$

$$M3 = \frac{10,0UI}{mL} \times \frac{2mL}{50mL} = \frac{0,40UI}{mL}$$

$$M4 = \frac{10,0UI}{mL} \times \frac{2,5mL}{50mL} = \frac{0,50UI}{mL}$$

$$M5 = \frac{10,0UI}{mL} \times \frac{3,1mL}{50mL} = \frac{0,62UI}{mL}$$

C. Comparación de dos rectas de regresión

Análisis de regresión conjunta

Ecuación de la recta de regresión:

$$Y \text{ (tamaño de halo en mm)} = 28,4 + 10,3 \log. \text{ concentración (X)} - 0,046 (Z) - 0,026 (XZ)$$

Predictor	Coeficiente	Coef. de EE	T	P
Constante	28,3879	0,1552	182,96	0,000
Log. concentración (x)	10,2831	0,3690	27,87	0,000
Z	-0,0462	0,2194	-0,21	0,834
XZ	-0,0257	0,5219	-0,05	0,961

← Test punto de corte

← Test paralelismo

Análisis de varianza

Fuentes	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	117,194	39,065	516,46	0,000
Error residual	56	4,236	0,076		
Total	59	121,430			

Análisis de regresión

Ecuación de la recta de regresión:

$$Y \text{ (tamaño de halo en mm)} = 28,4 + 10,3 \log. \text{ concentración (X)}$$

Predictor	Coeficiente	Coef. De EE	T	P
Constante	28,3648	0,1081	262,51	0,000
Log. concentración (x)	10,2703	0,2570	39,96	0,000

$$S = 0,270869$$

$$r = 98,2\%$$

$$r^2 = 96,5\%$$

Análisis de varianza

Fuentes	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	117,17	117,17	1597,04	0,000
Error residual	58	4,26	0,07		
Total	59	121,43			

Test de coincidencia:

$$F = \frac{\frac{SC(Z, XZ/X)}{2}}{\frac{SCE(X, Z, XZ)}{n-4}} = \frac{\frac{117,194 - 117,17}{2}}{\frac{4,236}{56}} = 0,0756 \rightarrow F(2,56)0,0756 = 0,9273$$

Origen de los datos empleados en el cálculo del test de coincidencia (marcados en negrita)

Anexo 3. Exactitud

A. Estándar (St)

- Estándar de referencia secundario bacitracina:

$$\text{Potencia} = \frac{75,9 \text{ UI}}{\text{mg}}$$

- Cálculo del peso del estándar de referencia secundario bacitracina:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Concentración deseada (UI)} \times 1 \text{ mg}}{\text{Potencia del estándar cada 1 mg (UI)}}$$

$$\text{Peso (mg)} = \frac{1000 \text{ UI} \times 1 \text{ mg}}{75,9 \text{ UI}}$$

$$\text{Peso} = 13,18 \text{ mg}$$

- Dilución del estándar en fiola de 100mL:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potencia} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}} \right)}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{1001,88 \text{ UI}}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{10,0188 \text{ UI}}{\text{mL}}$$

- Concentración del estándar de trabajo:

$$\text{St} = \frac{10,0188 \text{ UI}}{\text{mL}} \times \frac{2 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = \frac{0,40 \text{ UI}}{\text{mL}}$$

B. Muestra (M)

- Cálculos de los pesos del estándar de referencia secundario de bacitracina:

- Muestra al 100% = 13,2mg = 1000UI

- Muestra al 90% = $\frac{13,2\text{mg} \times 90\%}{100\%} = 11,9\text{mg} = 900\text{UI}$
- Muestra al 120% = $\frac{13,2\text{mg} \times 120\%}{100\%} = 15,9\text{mg} = 1200\text{UI}$

C. Análisis estadístico:

- **Homogeneidad de varianzas (test Cochran)**

$$G_{\text{exp}} = \frac{S^2 \text{ maxima}}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2} = \frac{1,61800}{1,61800 + 1,35532 + 0,02908} = 0,539$$

$$G_{\text{tablas}} = G_{3;2;0,05} = 0,8709$$

- **Determinación del sesgo**

$$e[\%] = \frac{\bar{b}}{\text{valor de referencia}} \times 100 = \frac{0,42}{100} \times 100 = 0,42\%$$

- **Test de student**

$$t_{\text{tablas}} = \frac{(100 - \bar{R})\sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 100,44| \times \sqrt{9}}{10,21} = 0,1293$$

$$t_{\text{tablas}} = G_{8;0,05/2} = 2,306$$

Anexo 4. Precisión: repetibilidad

A. Estándar (St)

- Estándar de referencia secundario bacitracina:

$$\text{Potencia} = \frac{75,9 \text{ UI}}{\text{mg}}$$

- Cálculo del peso del estándar de referencia secundario bacitracina:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Concentración deseada (UI)} \times 1\text{mg}}{\text{Potencia del estándar cada 1 mg (UI)}}$$

$$\text{Peso (mg)} = \frac{1000\text{UI} \times 1\text{mg}}{75,9\text{UI}}$$

$$\text{Peso} = 13,18\text{mg}$$

- Dilución del estándar en fiola de 100mL:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Peso(mg)} \times \text{Potencia} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}} \right)}{100\text{mL}}$$

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{1001,88\text{UI}}{100\text{mL}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{10,0188\text{UI}}{\text{mL}}$$

- Concentración del estándar de trabajo:

$$\text{St} = \frac{10,0188\text{UI}}{\text{mL}} \times \frac{2\text{mL}}{50\text{mL}} = \frac{0,40\text{UI}}{\text{mL}}$$

B. Muestra (M)

- Cálculo del peso de la muestra:

$$\text{Peso (g)} = \frac{\text{Concentración deseada (UI)} \times 100\text{g}}{\text{Potencia del m uestra cada 100 g (UI)}}$$

$$\text{Peso (g)} = \frac{1000\text{UI} \times 100\text{g}}{50000\text{UI}}$$

$$\text{Peso} = 2\text{g (peso teórico)}$$

- Concentración de trabajo de las muestras:

$$M = \frac{1000\text{UI}}{100\text{mL}} \times \frac{2\text{mL}}{50\text{mL}} = \frac{0,41\text{UI}}{\text{mL}}$$

C. Variabilidad de los resultados: (Desviación estándar de la media para $n = 6$)

$$S_r = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0,498}{\sqrt{6}} = 0,2033$$

D. Tolerancia:

$$\text{Tolerancia} = \frac{6S_r}{LS - LI} \times 100 = \frac{6 \times 0,2033}{120 - 90} \times 100 = 4,066\%$$

Anexo 5. Precisión Intermedia

A. Estándar (St)

- Estándar de referencia secundario bacitracina:

$$\text{Potencia} = \frac{75,9 \text{ UI}}{\text{mg}}$$

- Cálculo del peso del estándar de referencia secundario bacitracina:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Concentración deseada (UI)} \times 1 \text{ mg}}{\text{Potencia del estándar cada 1 mg (UI)}}$$

$$\text{Peso (mg)} = \frac{1000 \text{ UI} \times 1 \text{ mg}}{75,9 \text{ UI}}$$

$$\text{Peso} = 13,18 \text{ mg}$$

- Dilución del estándar en fiola de 100mL:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potencia} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}} \right)}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{1001,88 \text{ UI}}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{10,0188 \text{ UI}}{\text{mL}}$$

- Concentración del estándar de trabajo:

$$\text{St} = \frac{10,0188 \text{ UI}}{\text{mL}} \times \frac{2 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = \frac{0,40 \text{ UI}}{\text{mL}}$$

B. Muestra (M)

- Cálculo del peso de la muestra:

$$\text{Peso (g)} = \frac{\text{Concentración deseada (UI)} \times 100 \text{ g}}{\text{Potencia del m uestra cada 100 g (UI)}}$$

$$\text{Peso (g)} = \frac{1000\text{UI} \times 100\text{g}}{50000\text{UI}}$$

$$\text{Peso} = 2\text{g (peso teórico)}$$

- Concentración de trabajo de las muestras:

$$M = \frac{1000\text{UI}}{100\text{mL}} \times \frac{2\text{mL}}{50\text{mL}} = \frac{0,41\text{UI}}{\text{mL}}$$

C. Variabilidad de los resultados:

$$S_r = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{1,03}{\sqrt{6}} = 0,42\% \text{ (Desviación estándar de la media para } n = 6 \text{)}$$

D. Tolerancia

$$\text{Tolerancia} = \frac{6S_r}{LS - LI} \times 100 = \frac{6 \times 0,42}{120 - 90} \times 100 = 8,4\%$$

Anexo 6. Especificidad

A. Estándar (St)

- Estándar de referencia secundario bacitracina:

$$\text{Potencia} = \frac{75,9 \text{ UI}}{\text{mg}}$$

- Cálculo del peso del estándar de referencia secundario bacitracina:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Concentración deseada (UI)} \times 1\text{mg}}{\text{Potencia del estándar cada 1 mg (UI)}}$$

$$\text{Peso (mg)} = \frac{1000\text{UI} \times 1\text{mg}}{75,9\text{UI}}$$

$$\text{Peso} = 13,18\text{mg}$$

- Dilución del estándar en fiola de 100mL:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Peso(mg)} \times \text{Potencia} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}} \right)}{100\text{mL}}$$

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{1001,88\text{UI}}{100\text{mL}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{10,0188\text{UI}}{\text{mL}}$$

- Concentración del estándar de trabajo:

$$\text{St} = \frac{10,0188\text{UI}}{\text{mL}} \times \frac{2\text{mL}}{50\text{mL}} = \frac{0,40\text{UI}}{\text{mL}}$$

Anexo 7. Nivel de significación de la prueba de Cochran (α)

K (n° de grupos)														
v	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30	
1	0,9985	0,9669	0,9065	0,8412	0,7808	0,7271	0,6798	0,6385	0,6020	0,5410	0,4709	0,3894	0,2929	
2	0,9750	0,8709	0,7679	0,6838	0,6161	0,5612	0,5157	0,4775	0,4450	0,3924	0,3346	0,2705	0,1980	
3	0,9392	0,7977	0,6841	0,5981	0,5321	0,4800	0,4377	0,4027	0,3733	0,3264	0,2758	0,2205	0,1593	
4	0,9057	0,7457	0,6287	0,5441	0,4803	0,4307	0,3910	0,3584	0,3311	0,2880	0,2419	0,1921	0,1377	
5	0,8772	0,7071	0,5895	0,5065	0,4447	0,3974	0,3595	0,3286	0,3029	0,2624	0,2195	0,1735	0,1237	
6	0,8534	0,6771	0,5598	0,4783	0,4184	0,3726	0,3362	0,3067	0,2823	0,2439	0,2034	0,1602	0,1137	
7	0,8332	0,6530	0,5385	0,4584	0,3980	0,3535	0,3185	0,2901	0,2666	0,2299	0,1911	0,1501	0,1061	
8	0,8159	0,6333	0,5175	0,4387	0,3817	0,3384	0,3043	0,2768	0,2541	0,2187	0,1815	0,1422	0,1002	
9	0,8010	0,6167	0,5017	0,4241	0,3682	0,3259	0,2926	0,2659	0,2439	0,2098	0,1736	0,1357	0,0658	
10	0,7880	0,6025	0,4884	0,4118	0,3568	0,3154	0,2829	0,2568	0,2353	0,2020	0,1671	0,1303	0,0921	
16	0,7341	0,5466	0,4368	0,3645	0,3135	0,2756	0,2462	0,2226	0,2032	0,1737	0,1429	0,1108	0,0771	
36	0,6602	0,4748	0,3720	0,3066	0,2612	0,2278	0,2022	0,1820	0,1655	0,1403	0,1144	0,0879	0,0604	
144	0,5813	0,4031	0,3093	0,2513	0,2119	0,1833	0,1616	0,1446	0,1308	0,1100	0,0889	0,0675	0,0457	
∞	0,5000	0,3333	0,2500	0,2000	0,1667	0,1429	0,1250	0,1111	0,1000	0,0833	0,0667	0,0500	0,0333	

**Anexo 8. Distribución de t de Student. Áreas de cola bilateral en función de los
grados de libertad de la distribución.**

	α							
ν	0,50	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,002	0,001
1	1,000	3,078	6,314	12,706	31,821	63,653	318,289	636,578
2	0,816	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,328	31,600
3	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,214	12,924
4	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,713	8,610
5	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,894	6,869
6	0,718	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959
7	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,408
8	0,706	1,397	1,850	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041
9	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781
10	0,700	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,687
20	0,687	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850
30	0,683	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646
40	0,681	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,307	3,561
50	0,679	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678	3,261	3,495
60	0,679	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460
70	0,678	1,294	1,667	1,994	2,381	2,648	3,211	3,435
80	0,678	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,195	3,416
90	0,677	1,291	1,662	1,987	2,368	2,632	3,183	3,402
100	0,677	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,174	3,390
∞	0,675	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,290

Anexo 9. Nivel de significación del valor D_{máx} de la prueba de Kolmogorov.

Tamaño muestra (n)	Nivel de significación (α)		
	0,10	0,05	0,01
1	0,950	0,975	0,995
2	0,776	0,842	0,929
3	0,636	0,708	0,829
4	0,565	0,624	0,734
5	0,509	0,563	0,669
6	0,468	0,519	0,617
7	0,436	0,483	0,567
8	0,410	0,454	0,542
9	0,387	0,430	0,513
10	0,369	0,409	0,489
11	0,352	0,391	0,468
12	0,338	0,375	0,449
13	0,325	0,361	0,432
14	0,314	0,349	0,418
15	0,304	0,338	0,404
16	0,295	0,327	0,392
17	0,286	0,318	0,381
18	0,279	0,309	0,371
19	0,271	0,301	0,361
20	0,265	0,294	0,352
>20	$1,22/\sqrt{n}$	$1,36/\sqrt{n}$	$1,63/\sqrt{n}$